

Charakterisierung der Glutamat Decarboxylase - Antikörper beim Prädiabetes und manifesten Typ I Diabetes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Martina Christine Herrmann

aus Wertingen

Giessen 1998

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III und Poliklinik
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Drs. h. c. Federlin

Gutachter: Prof. Dr. von Hattingberg

Tag der Disputation: 2. Juni 1999

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1.	Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus Typ I	1
1.1	Genetik	2
1.2	Zelluläre Immunität	3
1.3	Inselzellantikörper (ICA)	4
1.4	Insulinautoantikörper (IAA)	5
1.5	Glutamat Decarboxylase (GAD)-Antikörper	5
1.6	Weitere Autoantigene	9
1.7	Fragestellung	10

II. MATERIAL UND METHODEN 11

1.	Untersuchte Population	
	(Familienstudie Giessen-Bad Oeynhausen)	11
1.1	Personen mit ICA positiven Seren, ohne IDDM	12
1.2	Typ I Diabetiker bei Diagnosestellung	13
1.3	Personen mit ICA negativen Seren, ohne IDDM	13
1.4	Übersicht der Anzahl von Antikörper-Bestimmungen	14
1.5	Übersicht der Kollektive bzw. Serumproben für die differenzierte Ergebnisauswertung	15
2.	ICA-Bestimmung (Testprinzip)	17
3.	IAA-Radioimmunoassay (Testprinzip)	18
4.	64 KD Antikörper-Bestimmung	19
4.1	Humane Langerhanssche Inseln	19
4.2	<i>In vitro</i> Markierung von Inselzellproteinen durch Inkorporation von ³⁵ S-Methionin	19

4.3	Zell-Lyse	20
4.4	Immunpräzipitation	20
4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
4.6	Coomassie-Färbung	24
4.7	Autoradiographie	25
4.8	Schematische Darstellung des indirekten 64 KD Ak-Nachweises	26
5.	GAD-Radioimmunoassay (Testprinzip)	28
5.1	Proteinexpression ausgehend von humaner Insel-GAD ₆₅ cDNA	28
5.2	Immunpräzipitationsanalyse	29
6.	Statistische Auswertung	30
III.	ERGEBNISSE	31
1.	Bestimmung der 64 KD Ak	31
1.1	Etablierung der Methode	31
1.2	Evaluierung an Kontrollkollektiven	35
1.3	Methodenvergleich mit dem 65 KD Ak-RIA (PETERSEN et al, 1994)	36
2.	Korrelation der neuen Marker zu den bereits bekannten Markern ICA und IAA	37
2.1	Korrelation von 64 KD Ak zu ICA	37
2.2	Korrelation von 65 KD Ak zu ICA	38
2.3	Korrelation von 64 KD Ak zu IAA	39
2.4	Korrelation von 65 KD Ak zu IAA	40
2.5	Zusammenfassende Darstellung	41
3.	Einfluß von Alter, Geschlecht und Zeitverlauf auf die Marker 64 KD Ak, 65 KD Ak, ICA und IAA	42
3.1	Einfluß des Alters	42
3.2	Einfluß des Geschlechts	44
3.3	Zeitverlauf	46

4.	Evaluierung der einzelnen Marker und Markerkombinationen bei Prädiabetikern hinsichtlich deren Prädiktion des IDDM	50
4.1	Prävalenz einzelner Marker	50
4.2	Frühester Antikörper-Nachweis	52
4.3	Zeitverlauf	53
4.4	Zusammenhang zwischen Markerkombinationen bzw. Titerhöhe und IDDM-Erkrankungsrisiko	61
4.4.1	Markerkombinationen	61
4.4.2	Titerhöhe	62
IV.	DISKUSSION	65
1.	Methoden der GAD Ak-Bestimmung	65
2.	Korrelation der GAD Ak zu ICA und IAA	68
3.	Einfluß von Alter, Geschlecht und Zeitverlauf auf GAD Ak	70
4.	Evaluierung von GAD Ak, ICA und IAA hinsichtlich deren Prädiktion und Prävention des IDDM	73
V.	ZUSAMMENFASSUNG	76
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	79
VII.	ANHANG	92

I. EINLEITUNG

1. AUTOIMMUNERKRANKUNG DIABETES MELLITUS TYP 1

Der Diabetes mellitus Typ I (Synonym: insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) zählt zu den schwerwiegendsten Stoffwechselerkrankungen mit einer Prävalenz von circa 0,3 % der mitteleuropäischen Bevölkerung. Die Inzidenzrate ist im Jugendalter am höchsten. Männer und Frauen erkranken etwa gleich häufig (CLASSEN et al., 1991).

Der Typ I Diabetes ist gekennzeichnet durch einen Insulinmangel, der als Folge einer fortlaufenden Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas entsteht. Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation sind nur noch etwa 10 - 20 % der Beta-Zellen vorhanden. Voraus geht ein Monate bis Jahre dauernder Autoimmunprozeß, der am ehesten durch T-Zellen vermittelt ist. Dennoch sind die ebenfalls auftretenden Autoantikörper aus zweierlei Gründen von Bedeutung. Zum einen sind sie möglicherweise gegen das gleiche Zielantigen gerichtet wie die autoreaktiven T-Zellen. Zum anderen können sie aufgrund ihres Auftretens in der prädiabetischen Phase dazu dienen, gefährdete Personen frühzeitig zu identifizieren (HARRISON 1990).

In den ersten Interventionsstudien mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A bei bereits manifest erkrankten Typ I Diabetikern konnte das Eintreten vollständiger Insulinabhängigkeit deutlich hinausgezögert, aber letztlich nicht verhindert werden (ASSAN et al., 1990; BOUGNERES et al., 1990). Außerdem ist diese Therapieform nicht spezifisch für den IDDM und es traten zum Teil beträchtliche Nebenwirkungen auf (FEDERLIN und BECKER, 1990).

Als Alternative zu einer lebenslangen Insulinsubstitution dient letztlich der Ersatz insulinproduzierenden Beta-Zellen durch eine Pankreas- oder Inseltransplantation (FEDERLIN et al., 1990; FEDERLIN et al., 1992; FEDERLIN, 1993). Intensive

Bemühungen gelten weiterhin der Optimierung der Transplantationstechnik um möglichst langfristige Therapieerfolge, auch bei erweiterter Indikationsstellung, zu erzielen (BRETZEL et al., 1995; JAEGER et al., 1995).

Nikotinamid, ein Vitamin-B3-Abkömmling, konnte im Tiermodell NOD-Maus die Entwicklung eines Diabetes verhindern, wenn es rechtzeitig gegeben wurde (YAMADA et al., 1982). Die vielfältige Wirkung von Nikotinamid beruht beispielsweise auf seiner Interaktion bei DNA-Reparaturmechanismen, seiner Funktion als Sauerstoffradikalfänger und dem Schutz der Beta-Zellen vor einem Mangel an intrazellulärem NAD (Nikotinamid Adenin Dinukleotid) (POCIOT et al., 1993; GALE 1996).

Angeregt durch eine erfolgversprechende offene Pilotstudie in Neuseeland (ELLIOTT und CHASE, 1991), wurden zwei plazebokontrollierte, doppelblinde Interventionsstudien in Deutschland bzw. Europa (DENIS und ENDIT) zur hochdosierten per os Behandlung von ICA positiven Verwandten I. Grades von Typ I Diabetikern initiiert. DENIS mußte wegen Nichtwirksamkeit 3/97 abgebrochen werden. Die Studie war auf den Nachweis einer starken Wirkung des Nikotinamid angelegt. ENDIT prüft einen weniger starken Effekt in einem anderen Kollektiv und wird weitergeführt. Die erste Zwischenauswertung wird 6/98 erwartet.

Da jedoch etwa 90 % der zukünftigen Typ I Diabetiker keine Familienanamnese bzgl. dieser Erkrankung aufweisen, kommt der Identifizierung von prädiktiven Markern, die zum Screening großer Populationen geeignet sind, größte Bedeutung zu.

1.1 GENETIK

Die genetische Suszeptibilität oder Resistenz, einen Typ I Diabetes zu entwickeln ist mit verschiedenen HLA (human leucocyte antigen)-Konstellationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 assoziiert. Die Vielzahl der beschriebenen HLA-Allele und -Allelkombinationen (BAISCH et al., 1990; KOCKUM et al., 1993; PUGLIESE et al., 1995) läßt jedoch erkennen, daß eine serienmäßige HLA-Genotypisierung alleine

zur Identifizierung von gefährdeten Personen nicht geeignet sein kann. Bei der relativ niedrigen Krankheitsprävalenzrate ist der positive prädiktive Wert der HLA-Konstellation zu gering.

Allerdings wurden bei der Auswahl der Kontrollseren für die vorliegende Untersuchung ausschließlich HLA DR 3 und 4 negative Personen berücksichtigt, da die Exprimierung von HLA DR 3 und/oder 4 bei kaukasischen Typ I Diabetikern mit 95% erheblich über dem Prozentsatz von 40% in der Allgemeinbevölkerung liegt (WOLF et al., 1983).

1.2 ZELLULÄRE IMMUNITÄT

Das Konzept einer Autoimmunpathogenese beim IDDM wurde durch Berichte über spezifisch gegen Beta-Zellen gerichtete Autoimmunphänomene unterstützt:

- 1.) Die Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln werden von mononukleären Zellen infiltriert (GEPTS et al., 1965).
- 2.) Bereits im präklinischen Stadium lassen sich im peripheren Blut T-Lymphozyten nachweisen, die in Anwesenheit von Inselzellantigenen proliferieren (HARRISON et al., 1991).

Der Glutamat Decarboxylase kommt dabei möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Initiierung des Autoimmunprozesses zu, worauf sowohl Untersuchungen bei NOD Mäusen (KAUFMAN et al., 1993) als auch beim humanen Typ I Diabetes (PANINA-BORDIGNON et al., 1995) hindeuten. Die Durchführung großangelegter T-Zell-Studien wird jedoch durch die aufwendige Untersuchungstechnik erheblich erschwert. Folglich ist das präklinische Diabetes-Screening auf die Suche nach humoralen Markern konzentriert.

1.3 INSELZELLANTIKÖRPER (ICA)

Die Erstbeschreibung von Antikörpern gegen pankreatische Inselzellen (ICA) bei Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus und weiteren autoimmunen Polyendokrinopathien stammt von BOTTAZZO et al. aus dem Jahre 1974. Diese Antikörper werden bis heute durch einen indirekten Immunfluoreszenztest auf Kryostatschnitten von menschlichem Pankreasgewebe nachgewiesen. Mittlerweile sind ICA etablierte prädiktive Marker für die Entwicklung eines Typ I Diabetes bei Verwandten I. Grades von IDDM-Patienten (SRIKANTA et al., 1986; JOHNSTON et al., 1989; BONIFACIO et al., 1990; RILEY et al., 1990), ebenso wie in der Allgemeinbevölkerung (BRUINING et al., 1987; KARJALAINEN et al., 1990; BOEHM et al., 1991; LANDIN-OLSSON et al., 1992). Zunächst wurde vermutet, daß deren Zielantigen ein Monosialoglycosid sei (NAYAK et al., 1985; COLMAN et al., 1988).

Bald darauf wiesen die Ergebnisse mehrerer Studien auf die Heterogenität der ICA hin:

- 1.) Die Analyse humaner monoklonaler ICA der Ig G Klasse (MICA 1-6) eines neu manifestierten IDDM-Patienten ergab, daß ICA teilweise identisch waren mit 64.000 Mr Antikörpern (RICHTER et al., 1991) und daß das Zielantigen dieser MICA die Glutamat Decarboxylase war (RICHTER et al., 1992).
- 2.) Eine immunhistochemische Untersuchung bei Verwandten I. Grades von Typ I Diabetikern ergab, daß eine Untergruppe der ICA Spezies- und Beta-Zell-spezifisch ist und nur diese mit einem niedrigeren Diabetesrisiko einhergeht, verglichen mit unspezifischen ICA (GIANINI et al., 1992).
- 3.) Ein Immunfluoreszenztest zeigte, daß ICA positive Seren von Typ I Diabetikern in zwei Gruppen zu unterteilen waren, da sich entweder ein selektives, auf Beta-Zellen beschränktes Färbemuster ergab oder eine Anfärbung von Alpha- und Beta-Zellen. Hier zeigten allerdings nur die unspezifischen ICA eine Assoziation mit einer Diabetesentwicklung (GENOVESE et al., 1992; MARSHALL et al., 1994).

Mehr noch als diese zum Teil widersprüchlichen Befunde, war die etwa 81 % ige Sensitivität, bei ca. 98 % iger Spezifität (LANDIN-OLSSON et al., 1989) ausschlaggebend, daß sehr bald nach zusätzlichen Markern für die Früherkennung eines Typ I Diabetes gesucht wurde.

1.4 INSULINAUTOANTIKÖRPER (IAA)

Erste Fallberichte über ein Insulin-Autoimmunsyndrom mit spontaner Hypoglykämie stammen aus den frühen siebziger Jahren (HIRATA et al., 1970; HIRATA und ISHIZU, 1972). Patienten, die nicht mit Insulin vorbehandelt worden waren, zeigten Insulinautoantikörper im Serum und eine pathologische Glucosetoleranz bzw. einen milden Diabetes. Erst nach mehr als 10 Jahren wurde dem Zusammenhang zwischen IAA und dem Typ I Diabetes mehr Aufmerksamkeit geschenkt, nachdem bei neu diagnostizierten (PALMER et al., 1983) und bei Prädiabetikern (ATKINSON et al., 1986; DEAN et al., 1986; SRIKANTA et al., 1986) IAA nachgewiesen wurden.

Zur IAA-Bestimmung werden sowohl Radioimmunoassays als auch ELISAs eingesetzt. Vergleichsuntersuchungen beider Tests im Rahmen internationaler IAA-Workshops (KUGLIN et al., 1990) machten die Überlegenheit der RIAs in Bezug auf die Diabetesprädiktion deutlich. Für die vorliegende Untersuchung wurde ein bereits etablierter kompetitiver RIA zur IAA-Bestimmung angewandt.

1.5 GLUTAMAT DECARBOXYLASE (GAD) - ANTIKÖRPER

Das Enzym Glutamat Decarboxylase (GAD) katalysiert die Biosynthese von γ -Aminobuttersäure (GABA) aus dem Primärsubstrat Glutamat unter der Mitwirkung von Pyridoxalphosphat (PLP) als Koenzym. Seit seiner Entdeckung im Gehirn von Wirbeltieren im Jahre 1950 (ROBERTS und FRANKL) bewiesen zahlreiche Untersuchungen die sowohl strukturelle als auch funktionelle Heterogenität dieses

Enzyms (ERLANDER und TOBIN, 1991). Mehrere Autoren erbrachten den Nachweis von zwei GAD immunoreaktiven Polypeptiden in Gehirnextrakten, die sich in Größe, Ladung und Antigenität unterscheiden (KAUFMAN et al., 1986; LEGAY et al., 1986; CHANG und GOTTLIEB, 1988). Dabei handelt es sich bei der menschlichen Glutamat Decarboxylase zum einen um die GAD67 Isoform mit einem Molekulargewicht von etwa 67,000 Dalton, deren cDNA einen offenen Leserahmen von 594 Aminosäuren enthält und zum anderen um GAD65 mit einem Molekulargewicht von etwa 65,000 Dalton und 585 Aminosäuren (BU et al., 1992). Die Aminosäuresequenzen sind zu 65 % identisch und zu 81 % ähnlich. Die größten Unterschiede finden sich in der NH₂-terminalen Region (BU et al., 1992). GAD65 und GAD67 werden von zwei separaten Genen kodiert (ERLANDER et al., 1991).

GABA stellt nicht nur den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des Zentralnervensystem dar. Sie besitzt ebenfalls das Exo- und Endokrinsystem modulierende, trophische und metabolische Funktionen (ERDÖ et al., 1990). Den ersten Hinweis auf das Vorkommen von GABA und seines biosynthetisierenden Enzyms, der GAD in den Langerhansschen Inseln des Pankreas lieferten OKADA et al. 1976. Darauf folgende immunhistochemische Studien bewiesen, daß sowohl GABA als auch GAD in einer B-Zellpopulation im Zentrum der Inseln kolokalisiert mit Insulin vorliegen (VINCENT et al., 1983; OKADA, 1986; GARRY, 1986; SAKAUE et al., 1987). Dabei könnte ein Teil der GABA, der gemeinsam mit Insulin sezerniert wird, eine Hemmung der Glucagonsekretion im Sinne einer Feedback-Regulation (RORSMAN et al., 1989) vermitteln. Darüber hinaus kann ein inhibitorischer Effekt auf die Somatostatin-Sezernierung als gesichert betrachtet werden (ROBBINS et al., 1984; SORENSON et al., 1991). Der größte Teil der GABA Immunreaktivität bzw. von GAD zeigte eine Kolokalisation mit sog. Synapsen-ähnlichen Mikrovesikeln (REETZ et al., 1991). Eine weitere Untersuchung im Elektronenmikroskop (CHRISTGAU et al., 1992) zeigte, daß GAD65 nach einer posttranslationalen Palmitoylierung der NH₂-terminalen Region in der Membran dieser Mikrovesikel verankert ist. Dieser Prozeß ist wahrscheinlich reversibel und unterliegt einer noch unbekannten Regulation, da die hydrophile GAD65 enzymatisch wieder aus der Membran gelöst werden kann.

Im Jahre 1982 konnte erstmals bei 8 von 10 neu diagnostizierten diabetischen Kindern gezeigt werden, daß deren Seren ein Inselzellprotein mit einem Molekulargewicht von circa 64 kDa immunpräzipitieren (BAEKKESKOV et al., 1982). Da diese Antikörper gegen das 64k Inselzellantigen teilweise schon mehr als 7 Jahre vor der klinischen Manifestation nachgewiesen werden konnten, zeichnete sich bereits deren Bedeutung als prädiktive diagnostische Marker eines Typ I Diabetes ab (BAEKKESKOV et al., 1987; ATKINSON et al., 1990; SEISSLER et al., 1992).

BAEKKESKOV und Mitarbeitern gelang es 1990, das 64K Autoantigen als Glutamat Decarboxylase zu identifizieren. Diese Arbeitshypothese war aus der Beobachtung entstanden, daß der Typ I Diabetes die Autoimmunerkrankung ist, die mit circa 18 % (6/33) am häufigsten mit dem Stiff-man-Syndrom (SMS) assoziiert ist, einer seltenen neurologischen Erkrankung, die mit schmerzhaften Muskelkrämpfen einhergeht (SOLIMENA et al., 1990). Etwa 60 % der Serum- und Liquorproben von SMS-Patienten wiesen Autoantikörper gegen GABAerge Neuronen auf und konnten selektiv die Beta-Zellen in Kryostatschnitten von Rattenpankreas immuncytochemisch anfärben (SOLIMENA et al., 1990). 23 % (10/43) der GAD Antikörper positiven Patienten hatten einen Typ I Diabetes und 9 % (4/43) eine pathologische Glucose-Toleranz (SOLIMENA und DeCAMILLI, 1991). Die anti-GAD Antikörper bei SMS-Patienten liegen im Vergleich zur Mehrheit der Typ I Diabetiker meist in höheren Titern vor. Sie sind zwar vorwiegend gegen lineare Epitope gerichtet, weshalb sie auch nach Denaturierung im Western Blot zu finden sind (BAEKKESKOV et al., 1990), aber auch gegen konformationsgebundene Epitope, ähnlich denen beim Typ I Diabetes (DAW 1996). Mittels vergleichender Immunpräzipitation unter Verwendung von 64K Protein aus Ratteninseln beziehungsweise GAD aus Gehirn gelang der Beweis, daß GAD sowohl in den Nervenzellen als auch in Beta-Zellen das dominante Autoantigen für die menschlichen Antikörper darstellt und damit identisch mit dem 64K Protein ist (BAEKKESKOV et al., 1990).

Es folgte die gentechnische Herstellung der beiden GAD Isoformen GAD65 und GAD67, die auf Chromosom 10 respektive Chromosom 2 kodiert werden (ERLANDER et al., 1991; KARLSEN et al., 1991; MICHELSEN et al., 1991; BU et al., 1992). Aufgrund verschiedener Immunpräzipitationsversuche entstand die Vermutung, daß die von BAEKKESKOV als 64 kDa geschätzte GAD das Produkt des GAD65 Gens und die 65K Form das Produkt des GAD67 Gens sein könnte (ERLANDER et al., 1991). Es bestehen jedoch spezies- und organspezifische Unterschiede in der Expression von GAD65 und GAD67 (GIORDA et al., 1991; KARLSEN et al., 1992; KIM et al., 1993), die die Versuchsergebnisse mit Ratteninseln (MICHELSEN et al., 1991; CHRISTGAU et al., 1991; CHRISTIE et al., 1992) nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen lassen.

Menschliche Inseln exprimieren ausschließlich das GAD65 Protein, das sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vorliegen kann (KIM et al., 1993). Lediglich als Transkriptionsprodukt konnte in Ribonuklease Nachweisassays auch die GAD67 mRNA in menschlichen Inseln gefunden werden, nicht jedoch in der in situ Hybridisierung und Immunhistochemie (CRAM et al., 1995), was die Bedeutung der GAD67 als Zielantigen eher gering erscheinen läßt.

GAD65 stellt die wesentliche immunogene Isoform der Glutamat Decarboxylase beim Typ I Diabetes dar, was von verschiedenen Arbeitsgruppen mit Hilfe von Präzipitationsexperimenten mit radioaktiv markierten Inseln und rekombinanter GAD65 und GAD67 gezeigt wurde (HAGOPIAN et al., 1993; VELLOSO et al., 1993; SEISSLER et al., 1993; LÜHDER et al., 1994).

1.6 WEITERE AUTOANTIGENE

Von den zahlreichen Autoantigenen, deren Rolle im Autoimmunprozeß bereits diskutiert wurde, seien hier nur die bedeutsamsten kurz aufgelistet.

Das 38 kDa Antigen ist ein derzeit nicht näher charakterisierter Bestandteil von Insulin sezernierenden Granula. Bei neumanifestierten Typ I Diabetikern gelang der Nachweis von proliferierenden T-Zellen im peripheren Blut (ROEP et al., 1991). 38 kDa Autoantikörper traten zum Diagnosezeitpunkt in 15 % (5/33) der untersuchten Seren auf, die ebenfalls 64k präzipitierten (DeAIZPURUA et al., 1992).

Ein weiteres potentielles Zielantigen mit einem Molekulargewicht von 52 kDa stellt die Carboxypeptidase H dar, die ebenfalls in den sekretorischen Granula vorhanden ist (AGUILAR-DIOSDADO et al., 1994).

Das 65 kD Heat Shock Protein (JONES et al., 1990) erwies sich als unbedeutend, da es sich sowohl physiologisch als auch immunkompetitiv vom 64 kD Inselzellantigen unterschied (ATKINSON et al., 1991).

Das Insulin-Vorläuferhormon Proinsulin wurde aufgrund von T-Zell-Experimenten als pathogenetisch bedeutsames Antigen in Betracht gezogen (GRIFFIN et al., 1995).

Antikörper gegen 37 und 40 kDa Antigene indizieren einen rasch fortschreitenden Krankheitsprozeß und dementsprechend eine in kurzer Zeit bevorstehende IDDM-Manifestation (CHRISTIE et al., 1994; BINGLEY et al., 1994). Neuere Untersuchungen identifizierten das Protein Tyrosin Phosphatase ähnliche IA-2 (Inselzellantigen ICA 512) als deren Zielantigen (BONIFACIO et al., 1995).

1.7 FRAGESTELLUNG

Den genannten Daten zufolge besteht das vorrangige Ziel der IDDM-Forschung in der Prävention dieser progredient zelldestruktiven Autoimmunerkrankung. Dazu bedarf es einer möglichst frühzeitigen Prädiktion, für die insbesondere der Nachweis von spezifischen Antikörpern geeignet ist. Im Vergleich zu den etablierten Markern ICA und IAA wurde in der vorliegenden Untersuchung der Stellenwert von GAD Antikörpern evaluiert, zumal durch die Entwicklung eines Radioimmunoassays (PETERSEN et al., 1994) eine relativ einfach durchzuführende Methode zur Verfügung gestellt werden konnte.

Anmerkung:

Zur Vereinfachung werden in der gesamten Arbeit diejenigen GAD Antikörper, die mittels Immunpräzipitationsassay bestimmt wurden, als 64 KD Ak bezeichnet.

Für die im RIA gemessenen GAD Antikörper hingegen wird die Bezeichnung 65 KD Ak synonym verwendet.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchung waren im Einzelnen:

- 1.) Etablierung der Methode zur 64 KD Ak-Bestimmung, deren Evaluierung an Kontrollkollektiven und Methodenvergleich mit dem 65 KD Ak-RIA (PETERSEN et al., 1994).
- 2.) Korrelation der beiden neuen Marker zu den bereits bekannten Markern ICA und IAA
- 3.) Einfluß von Alter, Geschlecht und Zeitverlauf auf GAD Ak, ICA und IAA
- 4.) Evaluierung der einzelnen Marker und Markerkombinationen bei Prädiabetikern hinsichtlich deren Prädiktion des IDDM.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. UNTERSUCHTE POPULATION

(Familienstudie Giessen - Bad Oeynhausen)

Für die vorliegende Arbeit wurden vorwiegend Seren verwendet, die im Rahmen einer 1985 begonnenen prospektiven Familienstudie gesammelt wurden. Diese Studie wurde von der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universität Giessen in Zusammenarbeit mit der Diabetesklinik Bad Oeynhausen durchgeführt. Eingeschlossen wurden Familien mit einem insulinpflichtigen Diabetiker als Indexperson und mindestens einem gesunden Geschwister unter 16 Jahren.

Von den Verwandten I. Grades, d. h. Eltern und Geschwister, wurden in halbjährlichen Abständen Serumproben gewonnen, die neben der Untersuchung von organspezifischen Autoantikörpern gegen Parietalzellen, Nebenniere, Schilddrüse sowie antinukleären Antikörpern, schwerpunktmäßig auf das Vorhandensein von ICA und IAA getestet wurden (FEDERLIN et al. 1987, BECKER et al. 1987, 1988, 1989a,b). Letztere sollten dazu beitragen, die Risikogruppe der später an einem Typ I Diabetes Erkrankenden bereits in der präklinischen Phase zu identifizieren.

Zu Beginn dieser Untersuchung umfaßte die Studie 881 Verwandte I. Grades von 262 Typ I Diabetikern:

- Eltern:	476	Väter:	223	(25,3 %)
		Mütter:	253	(28,7 %)
- Geschwister:	405	Brüder:	194	(22,0 %)
		Schwestern:	211	(24,0 %)

Der Gesamtbeobachtungszeitraum betrug 3392 Patientenjahre. Im Durchschnitt waren es 3,9 Jahre bei einer Spannweite von 0,5 bis 8 Jahren.

Im folgenden sollen nun die der Familienstudie entstammenden sowie weitere, in der Medizinischen Poliklinik und aus der Blutbank der Universität Giessen akquirierte Serumproben charakterisiert werden. Von den Personen, die in die Familienstudie eingeschlossen waren, wurden bis zu 3 Serumproben ausgewählt: von Blutentnahmen beim Eintritt in die Studie und nach einem Intervall von 2-3 bzw. 5-6 Jahren.

Sämtliche Seren wurden mit dem Einverständnis der Probanden gewonnen und unverzüglich nach der Blutentnahme bei -20 °C in Gefrierschränken aufbewahrt.

1.1 PERSONEN MIT ICA POSITIVEN SEREN, OHNE IDDM

34 Personen, von denen mindestens eine der bis dato verfügbaren Serumproben ICA positiv war, wurden in dieser Gruppe zusammengefaßt. Darunter befanden sich 31 Verwandte I. Grades aus der Giessen-Bad Oeynhausen-Studie, sowie 3 weitere Personen, die in der Medizinischen Poliklinik Giessen ebenfalls halbjährlich auf den Verlauf ihrer ICA-Titerhöhe hin untersucht wurden. Ausgewählt wurden insgesamt 91 Seren dieser Personen, bei denen in 77 % (70/91) ICA nachgewiesen werden konnten.

Die Zusammensetzung der Personengruppe mit ICA positiven Seren, ohne IDDM, folgt nun im Einzelnen:

- 1.) 31 Verwandte I. Grades, davon
 - 6 Väter
 - 7 Mütter
 - 10 Brüder
 - 8 Schwestern
- 2.) 3 weibliche Personen ohne Familienanamnese bzgl. eines Typ I Diabetes

Beobachtungszeitraum: 140 Patientenjahre, im Durchschnitt 3,5 Jahre pro Person

Alter: 3 - 48 Jahre, Durchschnitt: 24,7 Jahre

Sex Ratio: Männer : Frauen = 0,9

1.2 TYP I DIABETIKER BEI DIAGNOSESTELLUNG

Untersucht wurden Seren von 12 Typ I Diabetikern bei Diagnosestellung (gemäß der WHO-Kriterien), wobei sich diese Gruppe aus drei verschiedenen Populationen zusammensetzte:

- 1.) 7 Verwandte I. Grades, davon
 - 5 Brüder mit 12, 13, 22, 24 und 26 Jahren
 - 2 Schwestern mit 16 bzw. 25 Jahren
- 2.) 1 Patientin ohne IDDM-Familienanamnese mit 30 Jahren
- 3.) 4 männliche Typ I Diabetiker, die bei Manifestation erstmalig untersucht wurden, im Alter von 22, 24, 29 und 31 Jahren.

Alter bei Diagnose: 12 - 31 Jahre, Durchschnitt 22,8 Jahre.

Sex Ratio: Männer : Frauen = 3,0

1.3 PERSONEN MIT ICA NEGATIVEN SEREN, OHNE IDDM

Diese Gruppe umfaßte 29 Personen ohne IDDM, von denen sämtliche bis dato verfügbaren Serumproben ICA negativ waren. Die Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung der Übereinstimmung in Alter und Geschlecht mit der Gruppe der Personen mit ICA positiven Seren.

Diese Gruppe der Personen mit ICA negativen Seren, ohne IDDM, setzte sich aus zwei Populationen zusammen:

- 1.) 20 Verwandte I. Grades, davon
 - 5 Väter
 - 4 Mütter
 - 5 Brüder
 - 6 Schwestern

- 2.) 9 HLA DR3- und HLA DR4-negative Blutspender, davon
 - 4 männliche Personen
 - 5 weibliche Personen

Bei den Blutspendern der Blutbank Giessen wurden im Hinblick auf eine potentielle Knochenmarkspende zusätzlich die HLA-Antigene bestimmt. Von diesen wurden Probanden ausgewählt, bei denen keiner der Diabetes-assoziierten genetischen Marker HLA DR 3 oder HLA DR 4 nachgewiesen werden konnte.

Beobachtungszeitraum: 99 Patientenjahre, Durchschnitt 5,0 Jahre pro Person.

Alter: 3 - 50 Jahre, Durchschnitt: 25,6 Jahre

Sex Ratio: Männer : Frauen = 0,9

1.4 ÜBERSICHT DER ANZAHL VON ANTIKÖRPER-BESTIMMUNGEN

Die gewonnenen Ergebnisse basieren auf der Bestimmung von ICA, IAA und 65 KD Ak bei 75 Personen, von denen 56 ebenfalls auf das Vorhandensein von 64 KD Ak getestet wurden. Tabelle 1 gibt außerdem eine Aufschlüsselung der Anzahl an Personen, bei denen 1, 2 oder 3 Serumproben untersucht wurden bzw. die Gesamtanzahl der Proben.

Autoantikörper	Personen	1 Probe	2 Proben	3 Proben	Probenzahl gesamt
ICA	75	14	10	51	187
IAA	75	10	33	32	149
64 KD Ak	56	15	10	31	128
65 KD Ak	75	14	10	51	187

Tab. 1: Anzahl der Personen und jeweiligen Proben, die auf IDDM-Antikörper untersucht wurden.

1.5 ÜBERSICHT DER KOLLEKTIVE BZW. SERUMPROBEN FÜR DIE DIFFERENZIERTE ERGEBNISAUSWERTUNG

Die Beantwortung der einzelnen Fragestellungen erforderte eine Fokussierung auf jeweils unterschiedliche Kollektive bzw. ausgewählte Serumproben einzelner Personen, über die die folgende Auflistung einen Überblick geben soll. Die Numerierung wurde aus Gründen der vereinfachten Zuordnung analog zum Ergebnisteil vorgenommen:

ad 1.2 Evaluierung von 64 KD Ak und 65 KD Ak an zwei Kontrollkollektiven:

- a) negative Kontrollgruppe: Personen mit ausschließlich ICA negativen Seren
--> Querschnittsuntersuchung der ersten verfügbaren Serumproben
- a) positive Kontrollgruppe: IDDM-Patienten
--> Querschnittsuntersuchung der Serumproben bei Diagnosestellung

ad 1.3 Methodenvergleich mit dem 65 KD Ak-RIA (PETERSEN et al., 1994)

- > Erste verfügbare Serumproben mit Bestimmung von 64 KD Ak und 65 KD Ak

ad 2 Korrelation der neuen Marker zu den bereits bekannten Markern ICA und IAA

- > Querschnittsuntersuchung der jeweils ersten verfügbaren Serumproben aller Personen mit Bestimmung von 64 KD Ak oder 65 KD Ak und ICA oder IAA

ad 3.1 Einfluß des Alters auf die einzelnen Marker

- > Querschnittsuntersuchung der jeweils ersten Serumproben aller Personen

ad 3.2 Einfluß des Geschlechts auf die einzelnen Marker

- > Querschnittsuntersuchung der jeweils ersten Serumproben aller Personen

ad 3.3 Einfluß des Zeitverlaufs auf die einzelnen Marker

- > Längsschnittuntersuchung bei Personen mit zwei oder drei sequentiellen Serumproben

ad 4.1 Prävalenz einzelner Marker bei Prädiabetikern

--> Zusammenfassende Beurteilung der jeweiligen präklinischen Seren von 8 IDDM-Patienten bzgl. Antikörper-Positivität

ad 4.2 Frühester Antikörper-Nachweis bei Prädiabetikern

--> Erste verfügbare Serumprobe von 8 Prädiabetikern

ad 4.3 Zeitverlauf der Marker bei Prädiabetikern

--> Längsschnittuntersuchung von 8 IDDM-Patienten während präklinischer Phase bis einschließlich Diagnosestellung

ad 4.4 Zusammenhang zwischen Markerkombinationen bzw. Titerhöhe und Erkrankungsrisiko:

--> Einteilung der Gesamtpopulation im Hinblick auf Klinik und ICA-Positivität bzw. ICA-Negativität in allen Serumproben

ad 4.4.1 Markerkombinationen

--> Querschnittsuntersuchung der ersten Serumproben mit 64 KD Ak-, 65 KD Ak-, IAA-Bestimmung

ad 4.4.2 Titerhöhe

--> Querschnittsuntersuchung der ersten Serumproben mit 65 KD Ak-, IAA-Bestimmung

2. ICA - BESTIMMUNG (Testprinzip)

Inselzellantikörper wurden im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III in Giessen durch einen indirekten Immunfluoreszenztest auf Kryostatschnitten von menschlichem Pankreasgewebe der Blutgruppe 0 bestimmt (BECKER et al. 1988, 1989). Es wurde keine Fixierung verwendet. Die Inkubationszeit mit 25 µl Patientenserum bzw. positivem oder negativem Kontrollserum betrug 75 Minuten. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer folgte eine 45 minütige Inkubation mit FITC-markiertem Antiserum gegen humanes IgG, 1 : 20 mit PBS-Puffer verdünnt. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte mit Glycerin/PBS-Puffer-Gemisch 1 : 3 eingedeckelt und am selben Tag von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Probenidentität unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Die Höhe der ICA-Titer wurde mit Hilfe des offiziellen JDF (Juvenile Diabetes Foundation) Standardserums in JDF Einheiten ausgedrückt. Das Detektionslimit liegt bei 5 JDF Einheiten.

Dieser Assay wird in regelmäßigen Abständen in proficiency Tests evaluiert. Die Spezifität liegt bei 100 %, die Sensitivität bei 92 %.

3. IAA - RADIOIMMUNOASSAY (Testprinzip)

Der kompetitive Radioimmunoassay zur Bestimmung von Insulinautoantikörpern wurde im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III in Giessen nach einer Modifikation der Originalbeschreibung (PALMER et al. 1983) durchgeführt. Von jedem Serum wurden Quadruplikate mit jeweils 75 µl Serum analysiert. Zwei von diesen wurden mit einem Überschuß an kaltem, d. h. nicht radioaktiv markiertem Humaninsulin in Phosphatpuffer eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurden die vier Proben 7 Tage mit ^{125}J -Humaninsulin (HOECHST, Frankfurt) inkubiert. Zur Ausfällung der Immunkomplexe, bestehend aus an Antikörper gebundenem ^{125}J -Humaninsulin, wurden im ersten Schritt eine 14,3 % ige und als zweites eine 11 % ige Polyethylenglycol-Lösung verwendet. Die Aktivität der Proben wurde 5 Minuten in einem Gamma-Counter gemessen und nach Subtraktion der Hintergrundstrahlung als spezifische Aktivität in Prozent der Gesamtaktivität ausgedrückt. Nach Berechnung der tatsächlichen Bindung unter Berücksichtigung der Competition wurde anhand einer laborinternen Standardkurve der Wert semiquantitativ in nU/ml gebundenem Insulin angegeben.

Ab einem Schwellenwert von 40 nU/ml galt eine Probe als IAA positiv.

In den regelmäßig durchgeführten Qualitätskontrollen liegen sowohl Sensitivität als auch Spezifität bei 100 %.

4. 64 KD ANTIKÖRPER - BESTIMMUNG

Zur Bestimmung von 64 KD Antikörpern in menschlichen Seren wurde die Immunpräzipitationsmethode nach CHRISTIE et al., 1990, entsprechend der Modifikation von SEISSLER et al. 1992, Medizinische Klinik der Universität Ulm, durchgeführt.

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Nährmedien, Puffer-Lösungen, Chemikalien sowie Materialien und Geräte befindet sich im Anhangsteil.

4.1 HUMANE LANGERHANSSCHE INSELN

Die Isolierung humaner Langerhansscher Inseln wurde von der Inseltransplantationsgruppe der Medizinischen Klinik III unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Bretzel gemäß der Methode von RICORDI et al., 1988 durchgeführt. Als Spendermaterial dienten Pankreata von verstorbenen Organspendern. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich frisch isolierte Inseln verwendet, die nicht für eine Transplantation geeignet waren.

Im Anschluß an die Isolierung und Reinigung wurden die Inseln unter sterilen Kautelen in eine mit 10 ml RPMI + 10 % FCS gefüllte Zellkulturflasche überführt und bis zur Weiterverarbeitung maximal 24 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert.

4.2 *In vitro* MARKIERUNG VON INSELZELLPROTEINEN DURCH INKORPORATION VON ³⁵S-METHIONIN

10.000 frisch isolierte Inseln wurden über Nacht in einer Zellkulturflasche mit 30 ml RPMI + 10 % FCS im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur 2 x mit je 30 ml Methionin-freiem RPMI + 10 % FCS für 10 Minuten bei 100 x g gewaschen. Das Pellet wurde

anschließend mit 30 ml Methionin-freiem RPMI + 10 % FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Es wurden 5 mCi ^{35}S -Methionin hinzugefügt und über Nacht bei 37° C inkubiert, um eine biosynthetische Markierung der Inselzellproteine zu erzielen.

Am darauffolgenden Tag wurden die Inseln 2 x mit 30 ml RPMI + 10 % FCS (10 Minuten, 100 x g, Raumtemperatur) und 1 x mit 30 ml TRIS-Puffer gewaschen (10 Minuten, 100 x g, Raumtemperatur).

4.3 ZELL-LYSE

Ab jetzt wurden alle Schritte bei 4° C durchgeführt, einschließlich Vorkühlung der Zentrifuge.

Das Pellet wurde mit 4 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Inseln mittels Ultraschall (50 Watt, 1-Sekunden-Intervall, LOW) 1 Minute homogenisiert.

Es folgte eine Ultrazentrifugation des Homogenisats 30 Minuten bei 36.000 x g. Das Pellet wurde anschließend im Kühlraum 2 Stunden lang regelmäßig in 4 ml Triton-Puffer zur Proteinextraktion resuspendiert.

4.4 IMMUNPRÄZIPITATION (BEI 4° C)

Nach einer weiteren Ultrazentrifugation bei 16.000 x g für 30 Minuten wurde das unlösliche Material enthaltende Pellet entfernt. Der Überstand (4 ml), einschließlich des 64 KD Antigens wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zunächst 3 Stunden mit 1 ml Serum eines gesunden, ICA-, IAA- und GAD-Ak-negativen, HLA-typisierten Probanden (NHS = normales humanes Serum) inkubiert, sowie anschließend mit Protein A-Sepharose (PAS). Diese war durch 2-maliges Waschen von 3,5 ml PAS mit PBS-Puffer und anschließendes Resuspendieren in PBS-Puffer (Gesamtmenge: 4 ml) vorgereinigt worden. Das Verhältnis von Zell-Lysat zu NHS

zu PAS betrug demnach 4 : 1 : 4. Nach 1-stündiger Inkubation auf einem Schüttler wurde die PAS 5 Minuten bei 1.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Cups à 100 µl aufgeteilt.

Die Überstände à 100 µl wurden über Nacht mit je 25 µl des zu untersuchenden Serums präzipitiert. Die entstandenen Immunkomplexe wurden während 2 Stunden auf einem Schüttler an aufbereitete PAS (Herstellung siehe oben, Zugabe von je 100 µl) gebunden, zunächst 5 x mit Waschpuffer und dann 2 x mit PBS gewaschen.

Zur Entfernung der PAS wurde diese durch Zugabe von je 40 µl Elutionspuffer von den Proteinen getrennt während einer 45-minütigen Inkubation auf einem Schüttler im Inkubator. Nach 2-minütigem Zentrifugieren wurden die Überstände, die bei 64 KD Antikörper positiven Personen sowohl die radioaktiv markierte GAD als auch die 64 KD Antikörper enthielten, in neue Eppendorf-Cups überführt.

4.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) NACH LAEMMLI, 1970

Die immunpräzipitierten Proteine wurden ihrem Molekulargewicht entsprechend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden entweder kommerziell erhältliche 4 - 15 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (BIO-RAD) oder 10 % selbst hergestellte SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

1.) Herstellung eines 10 % SDS-Polyacrylamid-Minigels

1.1) Acrylamidlösungen

10 % Trenngel

40 % Acrylamid-Bis-Stammlösung	2,89	ml
1,5 M Tris , pH 8,8	1,56	ml
Aqua dest.	1,67	ml
10 % SDS	0,062	ml
10 % APS	0,031	ml
TEMED	0,0021	ml

Sammelgel

40 % Acrylamid-Bis-Stammlösung	0,583	ml
0,5 M Tris , pH 6,8	0,625	ml
Aqua dest.	1,230	ml
10 % SDS	0,025	ml
10 % APS	0,025	ml
TEMED	0,0013	ml

1.2) Gießen des Gels

Zwischen zwei 10 x 8 cm große, durch 1 mm dicke Teflonspacer voneinander getrennte Glasplatten, die in der Gel-Gießvorrichtung montiert waren, wurde

zunächst das Trenngel bis zu einer Höhe von 8 cm blasenfrei eingefüllt. Nach dessen Auspolymerisierung wurde in den freigebliebenen Glasplattenzwischenraum das Sammelgel eingefüllt und ein Teflonkamm mit 10 jeweils 10 mm hohen und 4 mm breiten Zähnen eingesetzt. So entstanden 10 Geltaschen, in die nach vollständiger Polymerisation am nächsten Tag die Probelösungen aufgetragen werden konnten. Dazu wurden je 2 Minigele in der Elektrophorese-Vorrichtung plaziert, die mit 1 x Laufpuffer bis zu einer Höhe von ca. 5 cm gefüllt war.

2.) Vorbereitung der Probelösungen

2.1) Molekulargewichtsmarker

- Marker 1 : 20 in Probenpuffer verdünnen.
- 5 Minuten auf 95° C erhitzen.
- Nach dem Abkühlen 5 µl pro Geltasche auftragen.

2.2) Zu untersuchende Proben

- Proben à 40 µl mit je 20 µl Probenpuffer versetzen.
- 5 Minuten auf 95° C erhitzen.
- Nach dem Abkühlen kurz zentrifugieren, falls Präzipitate entstehen und 20 µl vom Überstand pro Geltasche auftragen.

3.) SDS-PAGE

Anschließend wurde die innere Kammer der Elektrophorese-Vorrichtung bis ca. 1 cm über den oberen Glasplattenrand mit Laufpuffer aufgefüllt.

Die Elektrophorese-Stromstärke betrug 30 Minuten 16 mA, dann 1 Stunde 45 mA. In dieser Zeit hatte die Bromphenolblaubande des Probenpuffers den unteren Rand der Gele erreicht und die Auftrennung der Proteine war damit abgeschlossen. Die Gele wurden aus der Vorrichtung herausgenommen und angefärbt.

4.6 COOMASSIE - FÄRBUNG

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbelösung 30 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 0,1 - 2 µg Protein pro Bande.

Coomassie-Färbelösung

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250

- in 50 ml Ethanol 95 % unter Rühren lösen
- 100 ml Phosphorsäure 85 % hinzufügen
- auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

Färbelösung durch Filterpapier filtrieren.

Anschließend wurde das tiefblau gefärbte Gel solange in der mehrmals gewechselten Coomassie-Entfärbelösung gewaschen bis der Hintergrund klar und die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

Coomassie-Entfärbelösung

29 % Methanol

3 % Essigsäure

in Aqua dest.

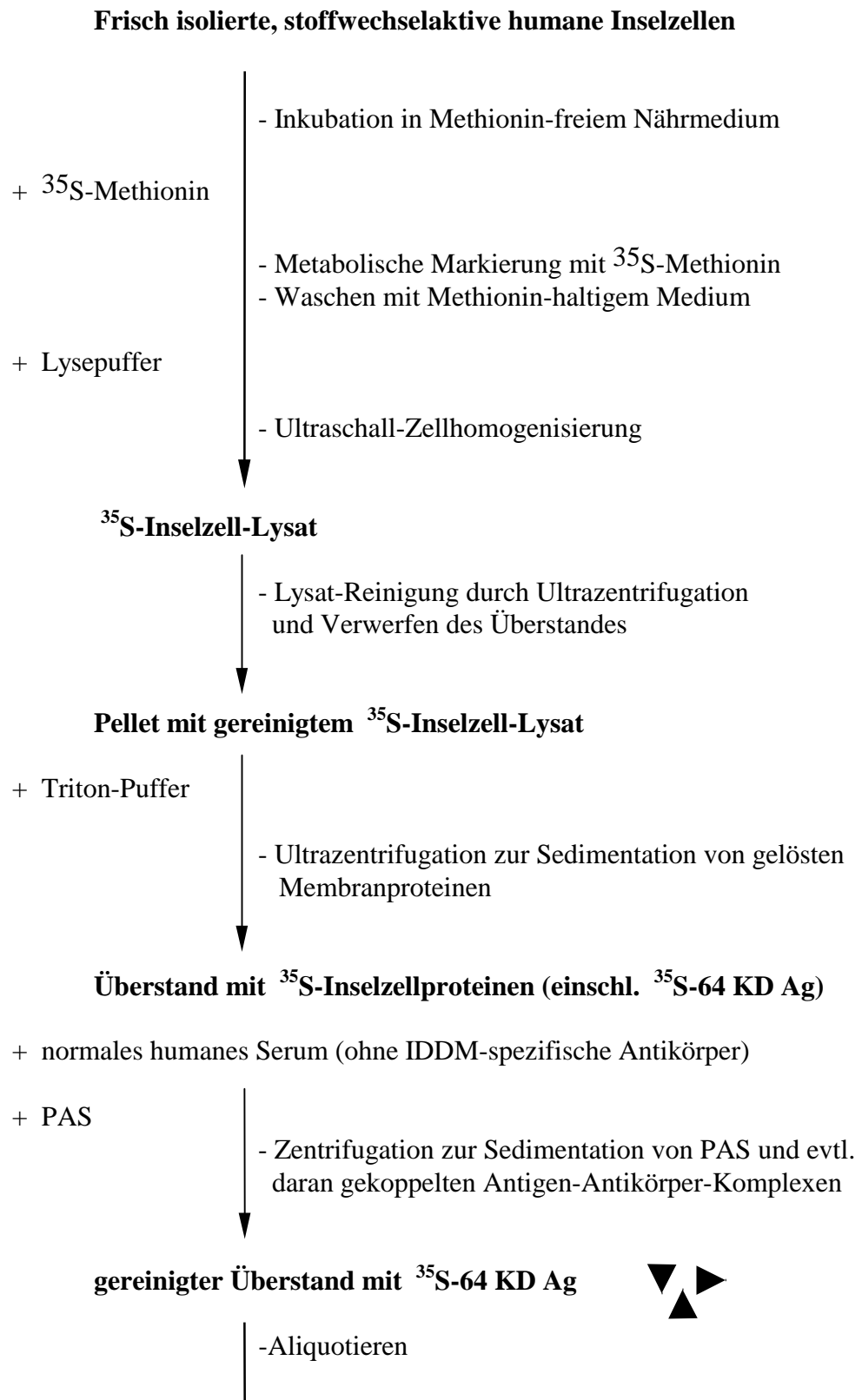
4.7 AUTORADIOGRAPHIE

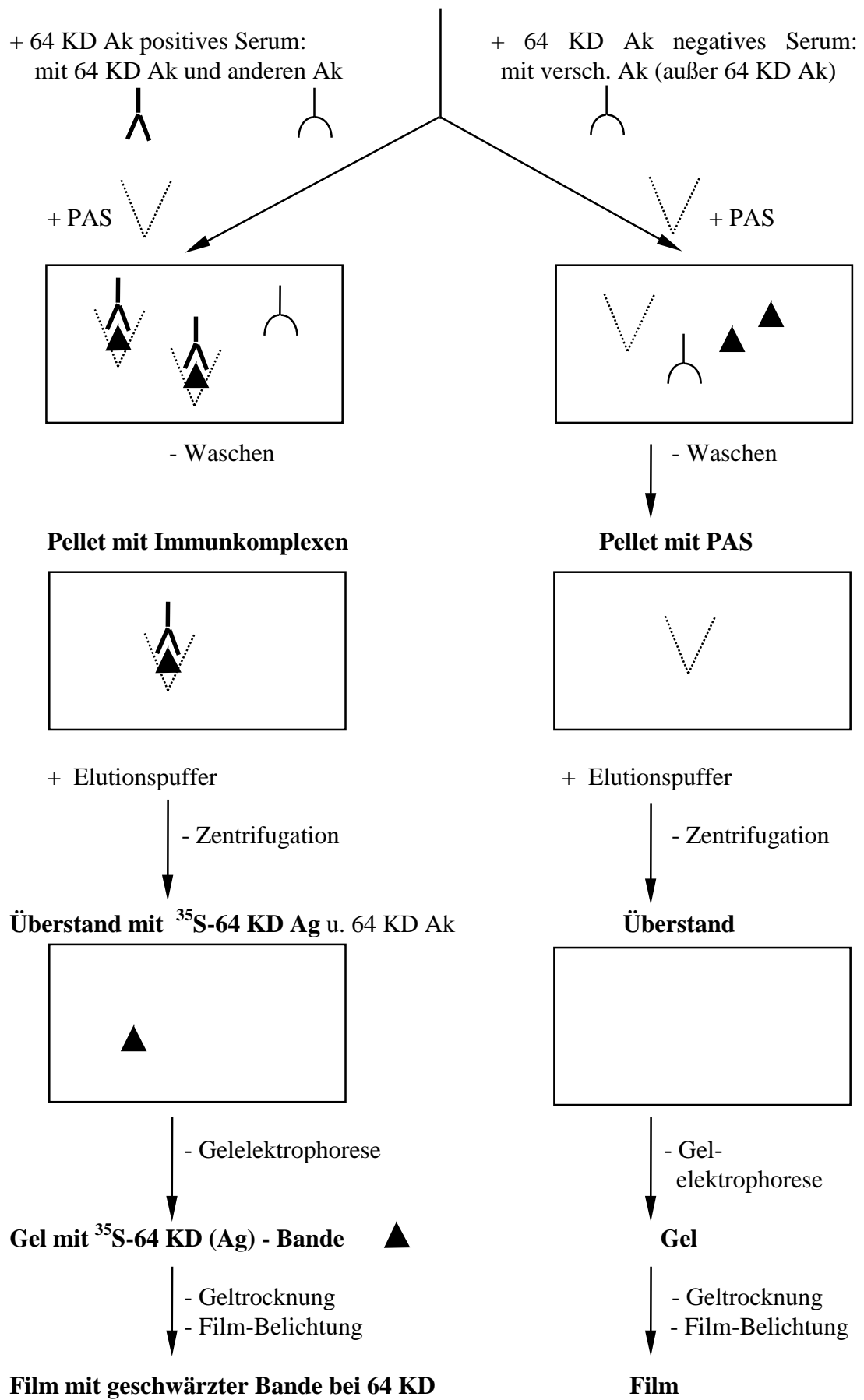
Nach kurzem Waschen in Aqua dest. wurde das Gel 15 Minuten in 96 % Essigsäure inkubiert. Dies diente der weitgehenden Verringerung des Wasseranteils, um eine Ausfällung von PPO zu verhindern. Die Imprägnierung in 20 % PPO und 96 % Essigsäure erfolgte für 30 Minuten.

Zur Trocknung wurde das Gel auf Filterpapier gelegt, mit Cellophanfolie bedeckt und 3-4 Stunden bei 80° C unter Vakuum in den Geltrockner gelegt. Danach haftete das Gel am Filterpapier und wurde mit diesem zusammen in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt und auf diesem befestigt. In einer Röntgenkassette wurde der Film nun für 14 Tage bei -80° C in einer Gefriertruhe belichtet. Die Filmentwicklung erfolgte entsprechend der Herstellervorschrift.

Für die Auswertung mußten zunächst die geschwärzten Proteinbanden auf dem Film identifiziert werden. Dazu wurden das getrocknete Gel und der entsprechende Röntgenfilm übereinandergelegt und die Lokalisation der Standard-Molekulargewichtsmarker auf letzteren übertragen. Auf der Höhe von 64 Kilodalton wurde anschließend von zwei voneinander unabhängigen Personen, denen die Identität der Proben nicht bekannt war, die Menge an ³⁵S markierter GAD semiquantitativ bestimmt. Als Vergleich dienten eine stark positive und eine negative Probe, die bei jedem Experiment mituntersucht wurden. Das Ergebnis wurde mit 0-4 bewertet, mit 0 für fehlende 64 kD Bande entsprechend einem negativen Antikörperbefund, 1 für fraglich, 2 für leicht, 3 für deutlich und 4 für stark positive Proben.

4.8 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INDIREKTEN 64 KD-ANTIKÖRPER-NACHWEISES





5. GAD - RADIOIMMUNOASSAY (Testprinzip)

Antikörper gegen rekombinante menschliche Glutamat Decarboxylase wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Hagedorn Research Institute in Gentofte, Dänemark bestimmt. Dafür wurden von den zu untersuchenden Seren, die in Gießen gelagert waren, kodierte Aliquots hergestellt. Diese wurden mit Trockeneis verpackt nach Dänemark gesandt. Dort wurde ein quantitativer Immunpräzipitations-Radioligandentest entsprechend der Methodenbeschreibung von PETERSEN et al. (1994) angewandt, dessen Ergebnisse anschließend mitgeteilt und die Kodierung entschlüsselt wurde.

Die Methode wird im Folgenden kurz beschrieben.

5.1 PROTEINEXPRESSION AUSGEHEND VON HUMANER INSEL-GAD₆₅ cDNA

Zusammengefasst wurde die humane Insel-GAD₆₅ cDNA aus einem Säugetier-Expressionsplasmid isoliert und in den KH117 *in vitro* Transkriptionsvektor kloniert. Nach der Vermehrung in *Escherichia coli* und erneuter Extraktion der GAD₆₅ cDNA folgte deren *in vitro* Transkription und Translation gemäß den Herstellervorschriften (PROMEGA, Madison). Kurz zusammengefasst wurde die klonierte cDNA durch Zugabe von T7 RNA Polymerase transkribiert. Während der anschließenden Translation der T7 transkribierten RNA-Fragmente in das gewünschte Protein wurde Methionin-freiem Kaninchen-Retikulozytenlysat (PROMEGA, Madison) ³⁵S-Methionin (AMERSHAM, UK) zugesetzt. Die dabei entstandene ³⁵S-markierte GAD₆₅ wurde über eine NAP5 Säule (PHARMACIA, Schweden) eluiert und nach Bestimmung der Immunreaktivität aliquotiert in Proben mit je ca. 30.000 cpm.

5.2 IMMUNPRÄZIPITATIONSANALYSE

Über Nacht wurde die ^{35}S -markierte GAD₆₅ mit dem zu untersuchenden Serum (im Verhältnis 1 : 25) inkubiert. Die Immunkomplexe wurden durch Zugabe von Protein A-Sepharose isoliert und mit TBST (Tris-buffered saline with Tween) gewaschen bevor im Szintillationszähler die vom jeweiligen Serum präzipitierte Menge an GAD₆₅ gemessen werden konnte.

In zusätzlichen Kompetitionsanalysen mit nicht-markierter, gereinigter rekombinanter humaner Insel-GAD 65 konnte eine lediglich geringe unspezifische Bindung bei IDDM Patienten nachgewiesen werden (PETERSEN et al., 1994).

Die Ergebnisse wurden als Indexwerte ausgedrückt (Formel zur Berechnung siehe PETERSEN et al., 1994). Wenn diese Indexwerte über dem Durchschnittswert (+ 2 SD) der Kontrollproben lag, wurde das Serum als 65 KD positiv gewertet. In der vorliegenden Untersuchung lag der Schwellenwert bei 67.

6. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der JLU Gießen.

Zur Zusammenhangsprüfung zwischen Beobachtungspaaren im nicht parametrischen Fall wurde der *X²-Test für Kontingenztafeln* verwendet. Bei einem Erwartungswert kleiner als 1 bzw. weniger als 80% aller erwarteten Zellhäufigkeiten größer als 5 kam in den bezeichneten Fällen die *Yates-Korrektur* zur Anwendung. Die Voraussetzung eines Stichprobenumfangs von mehr als 20 war durchgängig erfüllt.

Der *Spearman's Rang-Korrelationstest* diente als Verfahren zur Prüfung der Abhängigkeit von ordinalskalierten Merkmalen.

Mit Hilfe des nicht parametrischen *Mann-Whitney U-Tests* wurden die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben verglichen.

Als Signifikanzniveau zum Ausdruck der zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde $\alpha = 0,05$ zugrundegelegt. Dementsprechend wurden die Ergebnisse, aufgrund deren die Nullhypothese aufgegeben werden mußte, benannt:

$p \geq .05$	nicht signifikant
$p < .05$	signifikant
$p < .001$	hoch signifikant.

Anleitung für die genannten Methoden stammte aus folgender Literatur:

1. Werner J., Biomathematik und Medizinische Statistik, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1992
2. Clauß und Ebner, Statistik Band 1 und 2, Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main, 1989

III. ERGEBNISSE

1. BESTIMMUNG DER 64 KD AK

1.1 ETABLIERUNG DER METHODE

Zum Nachweis von 64 KD Ak wurde die Immunpräzipitationsmethode nach CHRISTIE et al., 1990 bzw. deren Modifikation von SEISSLER et al., 1992 angewandt. Dazu wurde aus einem radioaktiv markierten Inselzellhomogenisat das ca. 64 kD große Inselzellprotein Glutamat Decarboxylase von Seren präzipitiert, die 64 KD Ak enthalten. Von diesem Präzipitat konnte das eluierte 64 KD Antigen autoradiographisch nachgewiesen werden. Eine Bande bei dem Molekulargewicht von 64 kD entsprach dem radioaktiv markierten 64 KD Antigen und erlaubte einen Rückschluß auf das Vorhandensein von 64 KD Ak im Serum des untersuchten Probanden.

Die beiden folgenden Abbildungen enthalten beispielhaft Autoradiogramme mit jeweils acht Spuren von insgesamt 16 untersuchten Personen. Die Bewertung des Ergebnisses, sowie die Charakterisierung der untersuchten Personen enthält die jeweils anschließende Tabelle (Abbildung 1 und Tabelle 2, Abbildung 2 u. Tabelle 3).

Abbildung 1 zeigt das Resultat mit Seren von 3 männlichen IDDM-Patienten mit negativer Familienanamnese (Spur 1-3) mit stark bzw. deutlich positiven 64 kD Banden, wobei in Spur 1 die stärkste bei der vorliegenden Arbeit nachgewiesene 64 kD Bande dargestellt ist. Die Spuren 4-8 enthalten Proben von Verwandten von IDDM-Patienten: eine Diabetikerin mit fraglich positiver 64 kD Bande (Spur 4), sowie 2 männliche und 2 weibliche Prädiabetiker (Spur 5-8) mit stark bzw. leicht positiven 64 kD Banden.

Die Lokalisation der 64 kD Bande wurde jeweils durch einen Pfeil markiert.

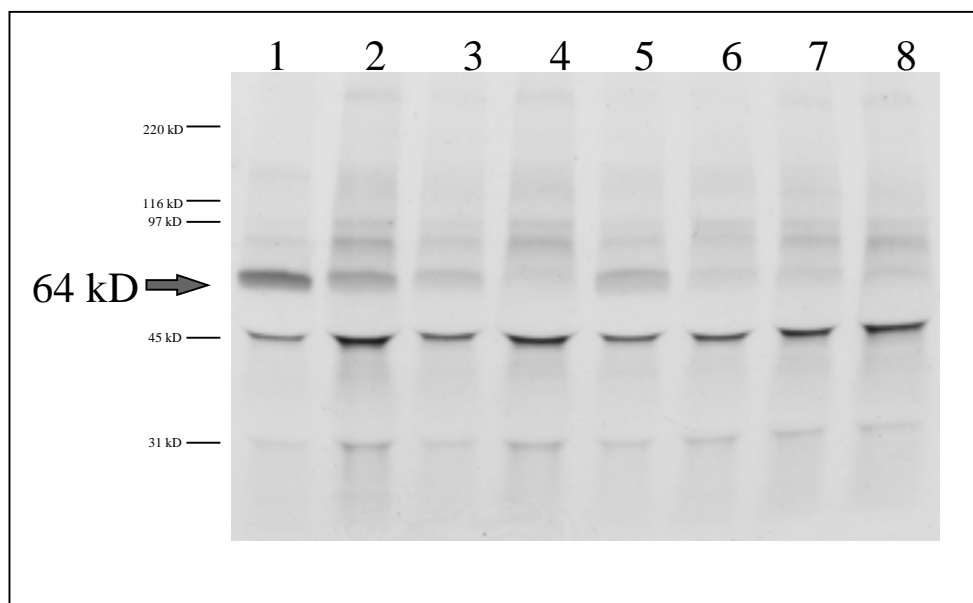


Abb. 1: Autoradiogramm eines SDS-Polyacrylamid-Gradientengels (4-15 %) mit ^{35}S -markierten Inselzellproteinen. Darstellung der 64 kD Bande bei IDDM-Patienten und Prädiabetikern (siehe Tabelle 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Dg.	IDDM	IDDM	IDDM	IDDM	Prä-IDDM	Prä-IDDM	Prä-IDDM	Prä-IDDM
Sex	m	m	m	w	w	m	m	w
Alt.	29	31	22	25,5	28	21,5	12,5	23
64	pos.(4)	pos.(4)	pos.(3)	pos.(1)	pos.(4)	pos.(2)	pos.(2)	pos.(2)
65	pos.(1798)	neg.(46)	pos.(819)	pos.(88)	pos.(1330)	pos.(522)	pos.(472)	pos.(231)
Fam.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.

Tab. 2: Ergebnis des 64 KD Ak-Nachweises (fettgedruckt) in Abbildung 1 und Charakterisierung der acht untersuchten Personen.

Legende:

Dg.: Diagnose
 IDDM: Diabetiker bei Diagnosestellung
 Prä-IDDM: Prädiabetiker, die zu einem späteren Zeitpunkt IDDM entwickelten
 m: männlich
 w: weiblich

Alt.: Alter in Jahren
 64 bzw. 65: 64 bzw. 65 KD Ak
 Fam.: Familienanamnese bzgl. IDDM

Abbildung 2 zeigt das Autoradiogramm mit Seren von 2 IDDM-Patienten mit negativer (Spur 1) bzw. positiver (Spur 4) IDDM-Familienanamnese, wobei nur letzterer eine leicht positive 64 kD Bande aufwies. Spur 2 und 3 zeigen eine stark bzw. leicht positive Bande bei gesunden Frauen mit ICA positiven Seren, mit negativer bzw. positiver IDDM-Familienanamnese. Die vier Kontrollpersonen (Spur 5-8) zeigten keine Bande im Bereich von 64 kD.

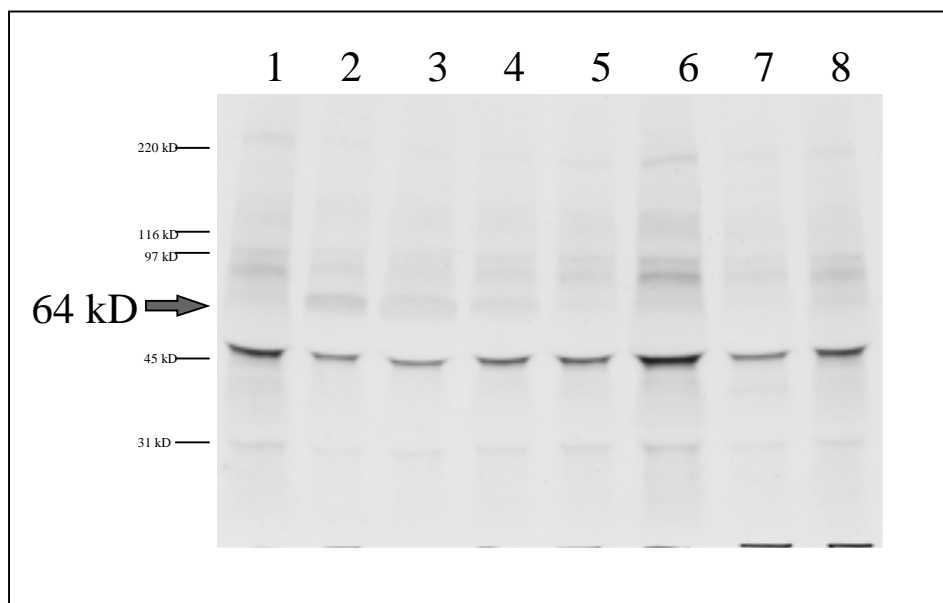


Abb. 2: Autoradiogramm eines SDS-Polyacrylamid-Gradientengels (4-15 %) mit ³⁵S-markierten Inselzellproteinen. Darstellung der 64 kD Bande bei einem IDDM-Patienten und zwei gesunden Personen mit ICA positiven Seren, nicht hingegen bei einem weiteren IDDM-Patienten und vier Kontrollpersonen (siehe Tabelle 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Dg.	IDDM	ICA pos.	ICA pos.	IDDM	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Sex	m	w	w	m	m	w	m	m
Alt.	24	23	19	24	24	34	24	25
64	neg.(0)	pos.(4)	pos.(2)	pos.(2)	neg.(0)	neg.(0)	neg.(0)	neg.(0)
65	pos.(100)	pos.(1446)	pos.(1247)	pos.(1209)	neg.(-17)	neg.(65)	neg.(38)	neg.(63)
Fam.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 3: Ergebnis des 64 KD Ak Nachweises (fettgedruckt) in Abbildung 2 und Charakterisierung der acht untersuchten Personen.

Legende:

Dg.: Diagnose
 IDDM: Diabetiker bei Diagnosestellung
 ICA pos.: ICA positiv, gesund
 Kontrolle: HLA DR 3/4 negativ
 m: männlich
 w: weiblich
 Alt.: Alter in Jahren
 64 bzw.65: 64 bzw. 65 KD Ak
 Fam.: Familienanamnese bzgl. IDDM

1.2 EVALUIERUNG AN KONTROLLKOLLEKTIVEN

In der Querschnittsuntersuchung der jeweils ersten verfügbaren Serumproben der einzelnen Personen fanden sich insgesamt bei 36 % (20/55) 64 KD Ak, bei 35 % (26/75) 65 KD Ak.

Im negativen Kontrollkollektiv, bestehend aus gesunden Probanden mit ausschließlich ICA negativen Seren, betrug die Prävalenz für 64 KD Ak 0 % (0/10), für 65 KD Ak 7 % (2/29).

Bei den neu erkrankten Typ I Diabetikern, die als positive Kontrollgruppe herangezogen wurden, konnten in 64 % (7/11) 64 KD Ak und in 83 % (10/12) 65 KD Ak nachgewiesen werden.

1.3 METHODENVERGLEICH MIT DEM 65 KD AK-RIA (PETERSEN et al., 1994)

Die beiden Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Glutamat Decarboxylase lieferten in 85 % (47/55) der Seren ein übereinstimmendes Ergebnis. 53 % (29/55) waren negativ sowohl für 64 KD Ak als auch für 65 KD Ak, 33 % (18/55) waren in beiden Tests positiv.

Von den 64 KD Ak positiven Seren waren 90 % (18/20) ebenfalls 65 KD Ak positiv. Umgekehrt konnten in 75 % (18/24) der 65 KD Ak positiven Seren gleichzeitig 64 KD Ak gefunden werden. Unterschiede in den beiden Bestimmungen waren somit hauptsächlich auf die 25 % der Proben zurückzuführen, die nur im GAD RIA positiv waren .

Der statistische Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 64 KD Ak und 65 KD Ak war hoch signifikant (X^2 -Test: Yates- $X^2 = 24,6$; $K = .58$; $p < .0001$).

Tabelle 4 zeigt die absoluten und relativen Häufigkeiten der autoradiographisch nachgewiesenen 64 KD Ak und der radioimmunologisch bestimmten 65 KD Ak bei 55 Personen.

		65 KD Ak		
		negativ	positiv	Summe
64 KD Ak	negativ	29	6	35
		52,7 %	10,9 %	63,6 %
	positiv	2	18	20
		3,6 %	32,7 %	36,4 %
	Summe	31	24	55
		56,4 %	43,6 %	100%

Tab. 4: Kontingenztafel für 64 und 65 KD Ak in Seren von 55 Personen

2. KORRELATION DER NEUEN MARKER ZU DEN BEREITS BEKANNTEN MARKERN ICA UND IAA

2.1 KORRELATION VON 64 KD AK ZU ICA

In den ersten verfügbaren Serumproben war bei 62 % (34/55) der Seren ein übereinstimmender Nachweis von ICA und 64 KD Ak möglich, der jeweils zur Hälfte bei beiden Autoantikörpern negativ oder positiv ausfiel (17/34).

Von der Gesamtzahl ICA positiver Seren waren 49 % (17/35) zugleich 64 KD Ak positiv. Demgegenüber waren in 85 % (17/20) der 64 KD Ak positiven Seren auch ICA nachweisbar.

Der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von ICA und 64 KD Ak war statistisch signifikant (X^2 -Test: Yates- $X^2 = 4,8$; $K = .32$; $p < .05$).

Tabelle 5 zeigt die absoluten und prozentualen Häufigkeiten von ICA und 64 KD Ak für 55 untersuchte Personen.

		64 KD Ak		
		negativ	positiv	Summe
ICA	negativ	17	3	20
		30,9 %	5,5 %	36,4 %
	positiv	18	17	35
		32,7 %	30,9 %	63,6 %
	Summe	35	20	55
		63,6 %	36,4 %	100%

Tab. 5: Kontingenztafel für ICA und 64 KD Ak in den Seren von 55 Personen

2.2 KORRELATION VON 65 KD AK ZU ICA

Bei 73 % (55/75) der Serumproben wurde eine Übereinstimmung im Nachweis von ICA und 65 KD Ak gefunden. Der Anteil der Seren mit einem positiven Ergebnis in beiden Tests betrug insgesamt 28 % (21/75). In 45 % (34/75) der Proben konnten weder ICA noch 65 KD Ak nachgewiesen werden.

Bei den ICA positiven Seren waren in 58 % (21/36) gleichzeitig 65 KD Ak nachweisbar. Hingegen waren in 81 % (21/26) der 65 KD Ak positiven Seren auch ICA nachweisbar.

Zwischen den beiden Autoantikörper Nachweismethoden bestand ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang (X^2 -Test: Yates- $X^2 = 15,2$; $K = .43$; $p < .001$).

Tabelle 6 stellt die absoluten und prozentualen Häufigkeiten von ICA und 65 KD Ak für die gesamte untersuchte Population von 75 Personen dar.

		65 KD Ak		
		negativ	positiv	Summe
ICA	negativ	34	5	39
		45,3 %	6,7 %	52,0 %
	positiv	15	21	36
		20,0 %	28,0 %	48,0 %
	Summe	49	26	75
		65,3 %	34,7 %	100%

Tab. 6 : Kontingenztafel für ICA und 65 KD Ak in den Seren von 75 Personen

2.3 KORRELATION VON 64 KD AK ZU IAA

Beim Vergleich von 64 KD Ak mit IAA zeigte sich in 75 % (41/55) der ersten Serumproben ein übereinstimmendes Ergebnis, wobei 58 % (32/55) übereinstimmend negativ und 16 % (9/55) bei beiden Untersuchungen positiv waren. Bei den 64 KD Ak positiven Seren konnten in 45 % (9/20) ebenfalls IAA nachgewiesen werden. Von den IAA positiven Seren erwiesen sich 75 % (9/12) zugleich 64 KD Ak positiv.

Der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 64 KD Ak und IAA war statistisch signifikant (X^2 -Test: Yates- $X^2 = 7,9$; $K = .39$; $p < .01$).

In Tabelle 7 sind die absoluten und relativen Häufigkeiten von 64 KD Ak und IAA bei 55 untersuchten Personen ersichtlich.

		IAA		
		negativ	positiv	Summe
64 KD Ak	negativ	32	3	35
		58,2 %	5,5 %	63,6 %
	positiv	11	9	20
		20,0 %	16,4 %	36,4 %
	Summe	43	12	55
		78,2 %	21,8 %	100%

Tab. 7: Kontingenztafel für 64 KD Ak und IAA in Seren von 55 Personen

2.4 KORRELATION VON 65 KD AK ZU IAA

In den ersten verfügbaren Serumproben wurde bei 75 % (56/75) eine Übereinstimmung im Nachweis von 65 KD Ak und IAA gefunden. Der mit 61 % (46/75) größere Teil bestand aus Seren, die sowohl 65 KD Ak als auch IAA negativ waren. Dagegen zeigten nur 13 % (10/75) übereinstimmend positive Ergebnisse.

38 % (10/26) der 65 KD Ak positiven Seren waren ebenfalls IAA positiv. Bei den IAA positiven Seren waren in 77 % (10/13) zugleich 65 KD Ak nachweisbar.

Statistisch war der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 65 KD Ak und IAA hoch signifikant (X^2 -Test: Yates- $X^2 = 10,2$; $K = .38$; $p < .01$).

Tabelle 8 zeigt die absoluten und relativen Häufigkeiten von 65 KD Ak und IAA für die gesamte untersuchte Population.

		IAA		
		negativ	positiv	Summe
65 KD Ak	negativ	46	3	49
		61,3 %	4,0 %	65,3 %
	positiv	16	10	26
		21,3 %	13,3 %	34,7 %
	Summe	62	13	75
		82,7 %	17,3 %	100%

Tab. 8: Kontingenztafel für 65 KD Ak und IAA in Seren von 75 Personen

2.5 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG

Wie die folgende Darstellung (Tabelle 9) zeigt, bestand zwischen den 65 KD Ak und ICA bzw. 64 KD Ak statistisch jeweils ein hoch signifikanter Zusammenhang (Yates-X²-Test). Signifikant waren außerdem die Korrelationen zwischen 64 KD Ak und ICA bzw. IAA, ebenso wie zwischen 65 KD Ak und IAA.

	ICA	IAA	64 KD Ak
64 KD Ak	Yates-X ² = 4.8 K = .32 p < .05 n = 55	Yates-X ² = 7.9 K = .39 p < .01 n = 55	
65 KD Ak	Yates-X ² = 15.2 K = .43 p < .001 n = 75	Yates-X ² = 10.2 K = .38 p < .01 n = 75	Yates-X ² = 24.6 K = .58 p < .0001 n = 55

Tab. 9: Übersicht über den Zusammenhang von 64 KD Ak und 65 KD Ak mit ICA und IAA im Yates-X²-Test (K = Kontingenz-Koeffizient, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n = Anzahl der ausgewählten Fälle)

3. EINFLUSS VON ALTER, GESCHLECHT UND ZEIT- VERLAUF AUF 64 KD AK, 65 KD AK, ICA UND IAA

3.1 EINFLUSS DES ALTERS

Um eine Abhängigkeit des Autoantikörper-Nachweises vom Lebensalter zu überprüfen, wurden für jeden der vier Autoantikörper die Prävalenzraten in den ersten 5 Lebensdekaden verglichen.

Die relativ gleichförmige Verteilung sämtlicher untersuchter Personen auf die 5 Lebensdekaden zum Zeitpunkt ihres Einschlusses in die Studie zeigt Abbildung 3.

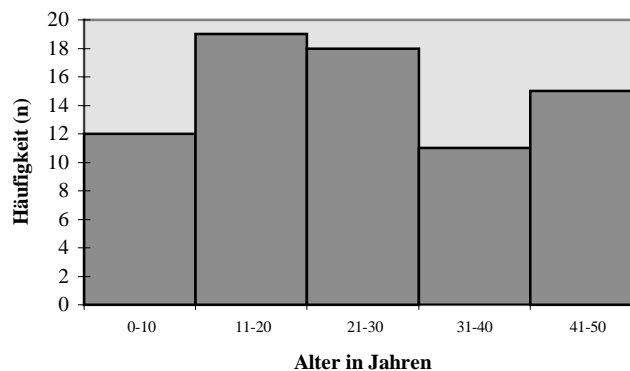


Abb. 3: Altersverteilung der untersuchten Population auf 5 Lebensdekaden

Die Prävalenz der ICA betrug bei den bis zu 10 jährigen Personen 50 % (6/12), im Alter zwischen 11 und 20 Jahren 53 % (10/19), zwischen 21 und 30 Jahren 44 % (8/18), zwischen 31 und 40 Jahren 45 % (5/11) und bei den 41 bis 50 jährigen 47 % (7/15). Somit waren in jeder Altersstufe etwa gleich viele Personen ICA positiv bzw. negativ (X^2 -Test: $p = \text{n.s.}$).

Ebenfalls kein signifikanter Unterschied fand sich bei den 64 KD Ak mit 29 % (2/7) Positiven in der ersten Dekade, 47 % (7/15) in der zweiten, 44 % (7/16) in der dritten, 14 % (1/7) in der vierten und 30 % (3/10) in der fünften Lebensdekade (X^2 -Test: $p = \text{n.s.}$).

Bei den 65 KD Ak konnte eine Prävalenz von 25 % (3/12) bei den bis zu 10 jährigen gefunden werden, von 53 % (10/19) zwischen 11 und 20 Jahren, 50 % (9/18) zwischen 21 und 30 Jahren, 9 % (1/11) zwischen 31 und 40 bzw. 20 % (3/15) bei den 41 bis 50 jährigen. Die Unterschiede in den Prävalenzraten zugunsten der jüngeren Personen waren signifikant (X^2 -Test: $X^2 = 9,7$; $K = .34$; $p < .05$).

IAA Positivität konnte ausschließlich bei Personen unter 28 Jahren nachgewiesen werden mit 25 % (3/12) bei den bis zu 10 jährigen, 32 % (6/19) im Alter zwischen 11 und 20 Jahren und 22 % (4/18) zwischen 21 und 30 bzw. 28 Jahren. Dieser Altersunterschied befand sich knapp unterhalb des Signifikanzniveaus (X^2 -Test: $X^2 = 8,9$; $K = .33$; $p = .06$). Bei den IAA bestand hingegen ein eindeutig signifikanter Unterschied des durchschnittlichen Lebensalters der IAA positiven und IAA negativen Personen (Mann-Whitney U-Test: $z = -2.5$; $p < .05$).

Der Vergleich der durchschnittlichen Lebensalter zeigte weder bei den ICA noch bei 64 oder 65 KD Ak einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney U-Test: jeweils $p = n.s.$).

Die Prävalenzraten für ICA, IAA, 64 KD Ak und 65 KD Ak innerhalb der fünf Alterskategorien sind in Abbildung 4 dargestellt.

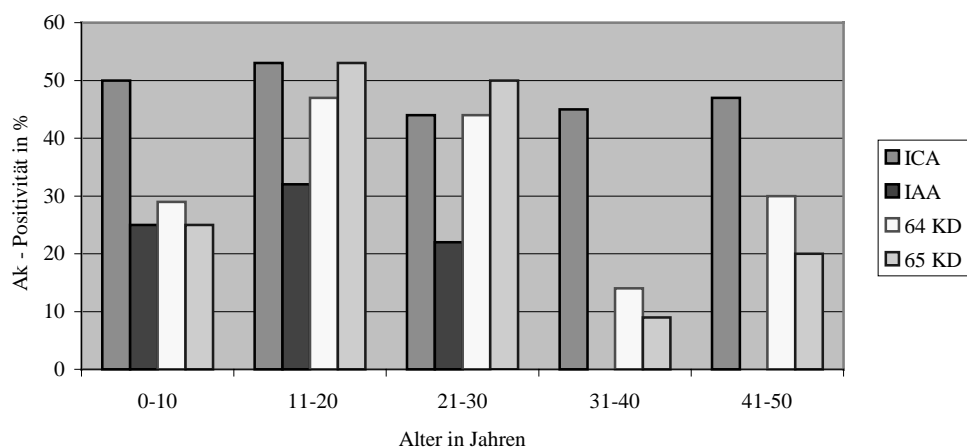


Abb. 4: Prävalenzraten der Autoantikörper in den ersten 5 Lebensdekaden

3.2 EINFLUSS DES GESCHLECHTS

Für die vier Personengruppen mit ICA-, 64 KD Ak-, 65 KD Ak- und IAA-positiven Seren wurde der prozentuale Anteil der Männer bzw. Frauen in der Gesamtpopulation, sowie getrennt für Verwandte und Nicht-Verwandte bestimmt.

48 % (36/75) der Seren waren ICA positiv. Der Anteil der Männer betrug 56 % (20/36), der Frauen entsprechend 44 % (16/36). Die geschlechtsspezifische Verteilung der ICA positiven Seren war bei Verwandten und Nicht-Verwandten identisch: 56 % (15/27) Männer, entsprechend 44 % (12/27) Frauen bei den Verwandten und 56 % (5/9) Männer, entsprechend 44 % (4/9) Frauen bei den Nicht-Verwandten.

64 KD Ak konnten in 36 % (20/55) der Gesamtpopulation, jeweils zur Hälfte bei Männern und Frauen (10/20) gefunden werden, wobei bei den Verwandten der Frauenanteil mit 54 % (7/13), hingegen bei den Nicht-Verwandten der Männeranteil mit 57 % (4/7) etwas höher lag.

In der Gesamtpopulation besaßen 35 % (26/75) 65 KD Ak positive Seren. 42 % (11/26) davon waren Männer, entsprechend 58 % (15/26) Frauen. Auch hier zeigte sich ein höherer prozentualer Anteil an Frauen bei den Verwandten mit 61 % (11/18). Bei den Nicht-Verwandten bestand kein Unterschied (jeweils 4/8).

Von den erstgenannten Antikörpern unterschieden sich die IAA mit 17 % (13/75) nicht nur durch ihre mehr als 50 % geringere Prävalenz, sondern auch durch einen durchgängig deutlich höheren Männeranteil. In der Gesamtpopulation betrug dieser 69 % (9/13), bei den Verwandten 70 % (7/10) und bei den Nicht-Verwandten 67 % (2/3).

Im χ^2 -Test für Kontingenztafeln ergab der Vergleich von Personen mit Antikörper-positiven und -negativen Seren weder für die Gesamtpopulation noch für Verwandte oder Nicht-Verwandte einen signifikanten Geschlechtsunterschied (jeweils $p = n.s.$).

Das folgende Säulendiagramm (Abbildung 5) zeigt - gruppiert nach Antikörpern - in jeder Säule den jeweiligen prozentualen Anteil der Männer bzw. Frauen mit Antikörper-positiven Seren in der Gesamtpopulation, bzw. bei den Verwandten und Nicht-Verwandten.

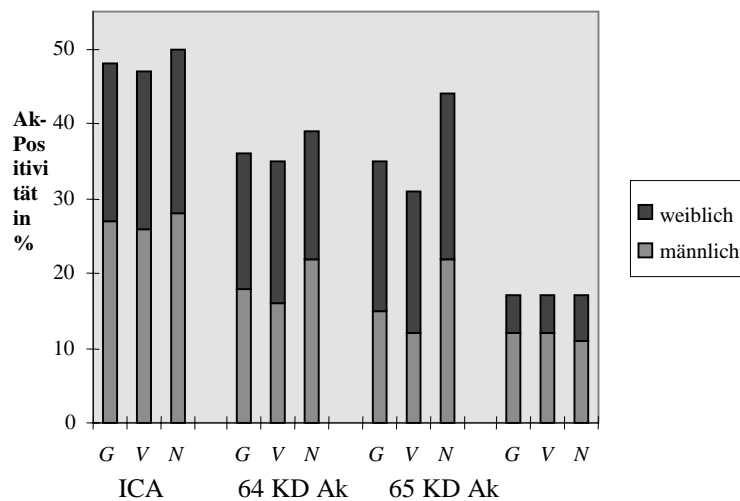


Abb. 5: Anteil der Männer bzw. Frauen an der Autoantikörper-Positivität bei der Gesamtpopulation (G), den Verwandten (V) und Nicht-Verwandten (N)

3.3 ZEITVERLAUF

Bei den Personen, von denen drei sequentielle Proben für den jeweiligen Autoantikörper untersucht wurden, fanden sich folgende unterschiedlich stark ausgeprägte Fluktuationen der Titerverläufe mit Serokonversion von negativ nach positiv bzw. umgekehrt oder lediglich intermittierender Positivität. Zusätzlich wird zum Vergleich die Anzahl der Personen mit konstant positivem bzw. negativem Antikörperbefund aufgeführt.

ICA (51 Personen): 17 immer positiv (max. 320 JDF units)
5 von negativ nach positiv (max. 20 JDF units)
2 nur intermittierend nach positiv (5 JDF units)
6 von positiv nach negativ (max. 20 JDF units)
21 immer negativ (0 JDF units)

64 KD Ak (30 P.): 11 immer positiv
1 von leicht positiv nach negativ
18 immer negativ

65 KD Ak (51 P.): 14 immer positiv (max. Index 1780)
4 von negativ nach positiv (max. Index 995)
1 nur intermittierend nach negativ (Index 108)
1 von positiv nach negativ (Index 498)
31 immer negativ (max. Index 66)

IAA (32 Personen): 5 immer positiv (max. 1300 Units)
1 von negativ nach positiv (800 Units)
4 nur intermittierend nach positiv (max. 94 Units)
2 von positiv nach negativ (130 Units)
20 immer negativ (max. 11 Units)

Daraus wurde eine hohe Persistenz im intraindividuellen Nachweis von 64 KD Ak ersichtlich mit 97 % (29/30) an konstant negativen bzw. positiven Autoantikörperbefunden. Zu 88 % (45/51) traf dies auch für die 65 KD Ak zu. Dagegen waren die Ergebnisse der IAA Bestimmungen nur in 78 % (25/32), ICA in 75 % (38/51) konstant gleichsinnig ausgeprägt.

Bei sämtlichen Personen, von denen mindestens zwei sequentielle Serumproben vorlagen, wurde die intraindividuelle Abhängigkeit der Antikörper-Titer statistisch überprüft. Dabei zeigte sich bei allen vier untersuchten Parametern eine hoch signifikante Abhängigkeit zwischen der ersten und zweiten, sowie der ersten und dritten Serumuntersuchung. Das höchste Maß an Korrelation erzielten in den ersten beiden Proben die ICA und die 64 KD Ak ($R = .94$ bzw. $R = .95$). Im Vergleich von erster und letzter Probe war der mit Abstand höchste Rangkorrelationskoeffizient ebenfalls bei den 64 KD Ak zu finden ($R = .89$).

Die folgenden Tabellen zeigen für ICA (Tabelle 10), 64 KD Ak (Tabelle 11), 65 KD Ak (Tabelle 12) und IAA (Tabelle 13) die Abhängigkeit von Antikörpertitern, die zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurden (R = Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient, p = Irrtumswahrscheinlichkeit, n = Anzahl untersuchter Personen).

	ICA 2	ICA 3
ICA 1	$R = .94$ $p < .001$ $n = 59$	$R = .63$ $p < .001$ $n = 53$

Tab. 10: Spearmans Rang-Korrelation von ICA der ersten Serumprobe (ICA1) mit ICA der zweiten (ICA 2) bzw. dritten (ICA 3) Verlaufsuntersuchung

	64 KD 2	64 KD 3
64 KD 1	R = .95 p < .001 n = 39	R = .89 p < .001 n = 33

Tab. 11: Spearmans Rang-Korrelation von 64 KD Ak der ersten Serumprobe (64 KD 1) mit 64 KD Ak der zweiten (64 KD 2) bzw. dritten (64 KD 3) Verlaufsuntersuchung

	65 KD 2	65 KD 3
65 KD 1	R = .68 p < .001 n = 59	R = .60 p < .01 n = 53

Tab. 12: Spearmans Rang-Korrelation von 65 KD Ak der ersten Serumprobe (65 KD 1) mit 65 KD Ak der zweiten (65 KD 2) bzw. dritten (65 KD 3) Verlaufsuntersuchung

	IAA 2	IAA 3
IAA 1	R = .70 p < .001 n = 40	R = .65 p < .001 n = 34

Tab. 13: Spearmans Rang-Korrelation von IAA der ersten Serumprobe (IAA 1) mit IAA der zweiten (IAA 2) bzw. dritten (IAA 3) Verlaufsuntersuchung

Bei Personen mit sequentiellen Serumproben, in denen sowohl GAD Ak als auch ICA und/oder IAA gefunden werden konnten, ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den neuen und den bereits etablierten Markern hinsichtlich der Reihenfolge, in der die Antikörper nachweisbar waren.

64 KD Ak und 65 KD Ak wurden bei zwei Personen bereits vier Jahre vor ICA detektiert. Bei einer weiteren Person fanden sich 65 KD Ak zwei Jahre, 64 KD Ak sogar vier Jahre vor ICA.

Dem Nachweis von IAA gingen bei drei Personen beide GAD Ak, bei einer weiteren Person nur 65 KD Ak voraus. Die zeitliche Differenz betrug etwa zwei Jahre.

Insgesamt gelang also der Nachweis von GAD Ak sowohl vor ICA in 7,7 % (3/39) aller Personen mit ICA positiven Seren, als auch vor IAA in 23,5 % (4/17) aller Personen mit IAA positiven Seren.

Hingegen gingen weder ICA noch IAA dem Nachweis der beiden GAD Ak voraus. Bei der einzigen Person mit einem IAA positiven Serum zwei Jahre vor 65 KD Ak Positivität waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls bereits 64 KD Ak nachweisbar.

4. EVALUIERUNG DER EINZELNEN MARKER UND MARKER-KOMBINATIONEN BEI PRÄDIABETIKERN HINSICHTLICH DEREN PRÄDIKTION DES IDDM

Die Bedeutung serologischer Marker für die Prädiktion des IDDM liegt darin, den präklinischen Krankheitsverlauf möglichst frühzeitig anzuzeigen. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weitere Auswertung der Daten auf die 8 Personen, die während des Beobachtungszeitraums tatsächlich einen Typ I Diabetes entwickelten.

4.1 PRÄVALENZ EINZELNER MARKER

Während der präklinischen Phase wiesen 5 der 8 untersuchten Personen in allen vier Antikörper-Tests positive Ergebnisse auf. Dagegen fanden sich bei dem 12 jährigen Bruder eines Diabetikers (Patient Nr. 6) ausschließlich ICA und IAA. Eine 16 jährige Schwester (Patientin Nr. 7) wies ausschließlich 65 KD Ak-Positivität auf.

Daraus errechnete sich für die präklinische Phase eine Prävalenz von 63 % (5/8) für 64 KD Ak und jeweils 75 % (6/8) für ICA, IAA sowie 65 KD Ak.

Bei Diagnosestellung betrug die ICA-Prävalenz ebenfalls 75 % (6/8). 64 KD Ak und IAA waren nur noch in 57 % (4/7) bzw. 63 % (5/8) nachweisbar. Hingegen stieg die Prävalenz der 65 KD Ak auf 88 % (7/8) an.

Die folgende Tabelle 14 gibt zunächst zusammenfassend eine Übersicht über die klinischen Charakteristika dieser IDDM-Patienten. Der Antikörperstatus wurde - soweit verfügbar - bei jedem Patienten getrennt dargestellt für die Proben aus der prädiabetischen Phase und für diejenige bei Diagnosestellung.

Eine differenzierte Betrachtung der Reihenfolge des Auftretens einzelner Antikörper, deren Prävalenzraten sowie der Zeitverläufe bei diesen Patienten schließt sich in den Kapiteln 4.2 und 4.3 an.

Tab. 14: Klinische Charakterisierung von 8 IDDM-Patienten und Übersicht der Ergebnisse von ICA-, 64 KD Ak-, 65 KD Ak- und IAA-Bestimmungen in der prädiabetischen Phase (Prä-IDDM) und bei Diagnosestellung (IDDM)

Familien- anamnese bzgl. IDDM	Patient Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose (in Jahren)	ICA Prä-IDDM	ICA IDDM	64 KD Ak Prä-IDDM	64 KD Ak IDDM	65 KD Ak Prä-IDDM	65 KD Ak IDDM	IAA Prä-IDDM	IAA IDDM
negativ	1	w	30	+	+	+	+	+	+	+	+
"	2	m	24	+	+	+	+	+	+	+	+
Geschwister	3	m	22	+	+	+	+	+	+	+	+
"	4	m	13	+	+	+	n.u.	+	+	+	-
"	5	w	25,5	+	+	+	+	+	+	+	-
"	6	m	12	+	+	-	-	-	-	+	+
"	7	w	16	-	-	-	-	+	+	(-)°	+
"	8	m	26	-	-	-	-	(-)*	+	-	-
				6 / 8 pos. 75%	6 / 8 pos. 75%	5 / 8 pos. 63%	4 / 7 pos. 57%	6 / 8 pos. 75%	7 / 8 pos. 88%	6 / 8 pos. 75%	5 / 8 pos. 63%

Legende:

m : männlich
w: weiblich

+ : positiv
- : negativ
n.u.: nicht untersucht

(-) * : negativ 3 Jahre vor Diagnose
(-) ° : negativ 2 Jahre vor Diagnose

4.2 FRÜHESTER ANTIKÖRPER-NACHWEIS

Die ersten verfügbaren Serumproben dieser 8 Patienten stammten durchschnittlich aus einer Zeit von 37,4 Monaten (Spannweite 8 bis 77 Monate) vor Diagnose.

Die am weitesten zurückliegende Serumprobe stammte von dem 6 jährigen Bruder eines Typ I Diabetikers (Patient Nr. 6). Diese Probe zeigte einen deutlich positiven ICA- und IAA-Befund bei Negativität für 64 und 65 KD Ak.

Der früheste Nachweis von 64 und 65 KD Ak gelang bei einem 20 jährigen Nicht-Verwandten (Patient Nr. 2) 47 Monate vor Diagnose, der zugleich ICA und IAA aufwies.

Die Abbildung 6 zeigt für die Prädiabetiker (Patient Nr. 1 bis 8) den jeweiligen Antikörperstatus zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme. Die Zeit bis zur IDDM-Manifestation wurde in Monaten angegeben.

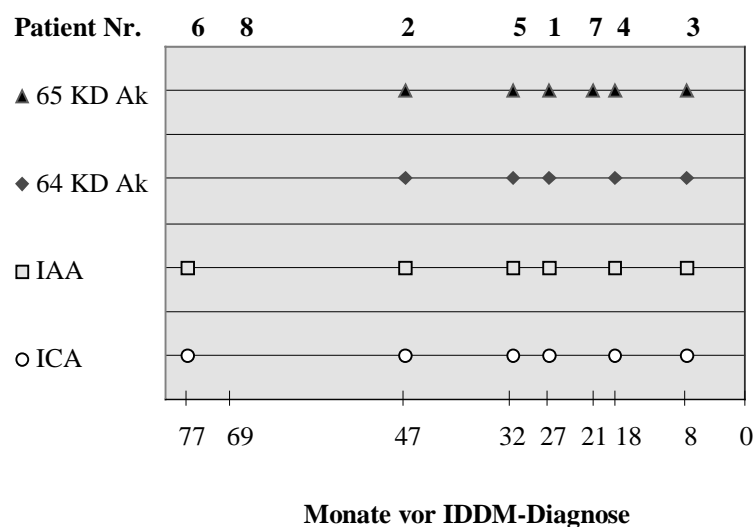


Abb. 6 : Antikörperstatus von 8 IDDM-Patienten während der präklinischen Phase, zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme

4.3 ZEITVERLAUF

Die Zeitverläufe der ICA, IAA und GAD Ak sollen nun einzeln dargestellt werden (Abbildungen 7 bis 14).

Stellvertretend für die gegen GAD gerichteten Autoantikörper (GAD Ak) wurden dazu die quantitativen Daten für 65 KD Ak verwendet.

Bei der Patientin Nr. 1, deren Autoantikörper-Titerverlauf in Abbildung 7 dargestellt ist, waren 2 Jahre vor Diagnosestellung bereits vergleichbar hohe Titer wie bei Manifestation von ICA (320 resp. 320 JDF units) und 65 KD Ak (Index 1330 resp. 1232) nachweisbar. Der IAA-Titer stieg von 130 auf 250 Units bei Diagnose an.

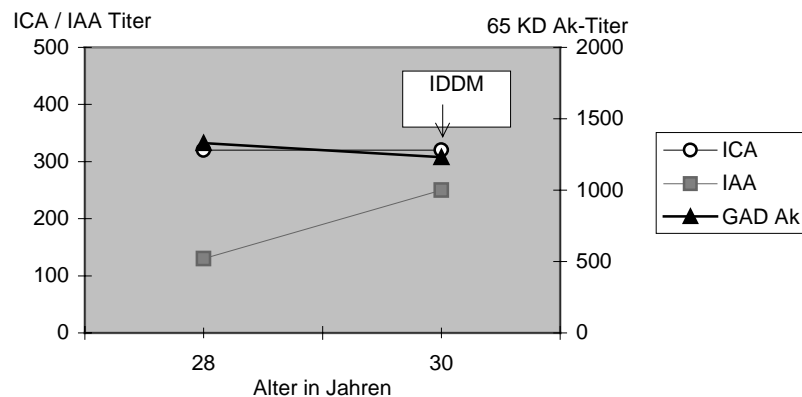


Abb. 7: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patientin Nr. 1 ohne Familienanamnese bzgl. eines IDDM. Manifestationsalter: 30 Jahre

Bei dem Patienten Nr. 2, dessen Antikörper-Titerverlauf in Abbildung 8 dargestellt ist, konnten sowohl 4 und 2 Jahre vor als auch bei Diagnosestellung sehr hohe Titer von 65 KD Ak (Index 1486, 1370 und 1209) und von IAA (240, 240 und 138 Units) nachgewiesen werden. ICA waren ebenfalls zu jedem Zeitpunkt positiv, jedoch in geringerer Titerhöhe (40, 20 und 40 JDF units).

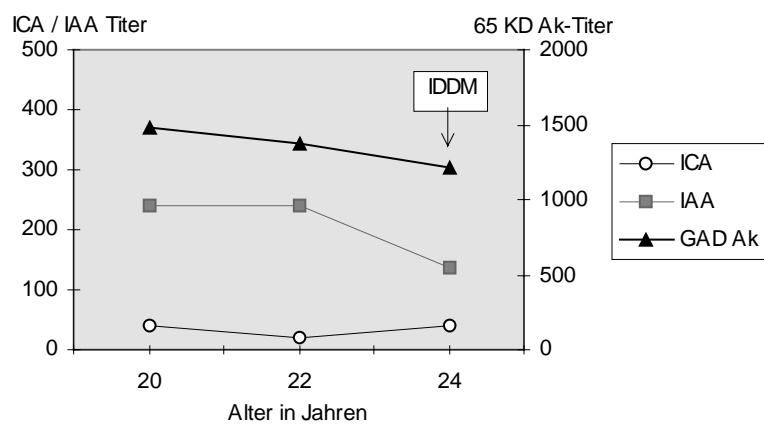


Abb. 8: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patient Nr. 2 ohne Familienanamnese bzgl. eines IDDM. Manifestationsalter: 24 Jahre.

Die höchsten IAA-Titer in der gesamten Population wurden bei dem Patienten Nr. 3 gemessen, dessen Antikörperstatus ein halbes Jahr vor und bei Diagnose in Abbildung 9 dargestellt ist (500 bzw. 475 Units). Im Vergleich dazu lagen die Titer von ICA (80 JDF units bei beiden) und 65 KD Ak (Index 522 bzw. 166) im mittleren Bereich.

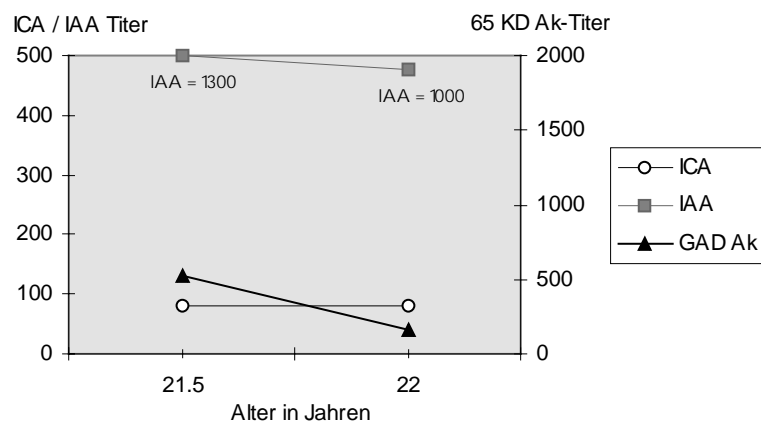


Abb. 9: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patient Nr. 3 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 22 Jahre.

In Abbildung 10 ist der Titerverlauf des Patienten Nr. 4 dargestellt, der ein Jahr nach Einschluß in die Familienstudie einen Typ I Diabetes entwickelte und bei den halbjährlichen Untersuchungen jeweils etwa konstant hohe Titer von ICA (80, 160 und 80 JDF units) und 65 KD Ak (Index 406, 472 und 274) aufwies. Hingegen waren die zunächst nachweisbaren IAA (59 Units) ein halbes Jahr später, sowie bei Diagnose nicht mehr nachweisbar (0 Units).

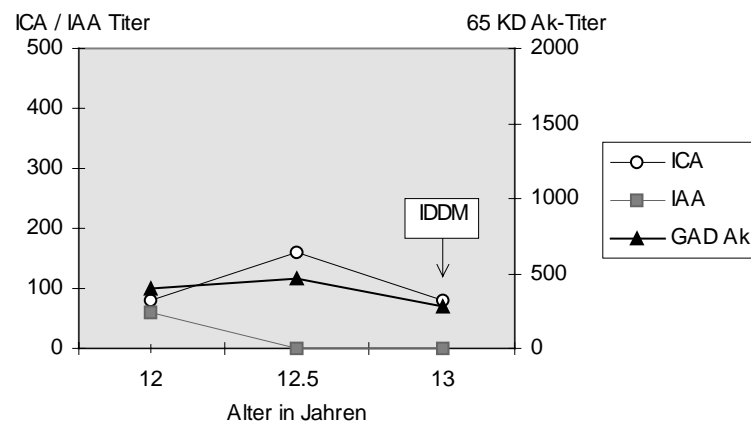


Abb. 10: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patient Nr. 4 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 13 Jahre.

Bei der Patientin Nr. 5, deren Autoantikörper-Titerverlauf in Abbildung 11 gezeigt ist, wurden alle drei Autoantikörper bereits mehr als 2 Jahre vor Diagnose gefunden. Relativ konstant konnten ICA (80, 160 und 80 JDF units) und 65 KD Ak (Index 231, 204 und 88) nachgewiesen werden. IAA-Positivität war lediglich in der Probe 2 Jahre vor Manifestation feststellbar, jedoch nicht mehr bei Diagnose (0, 70 und 0 Units).

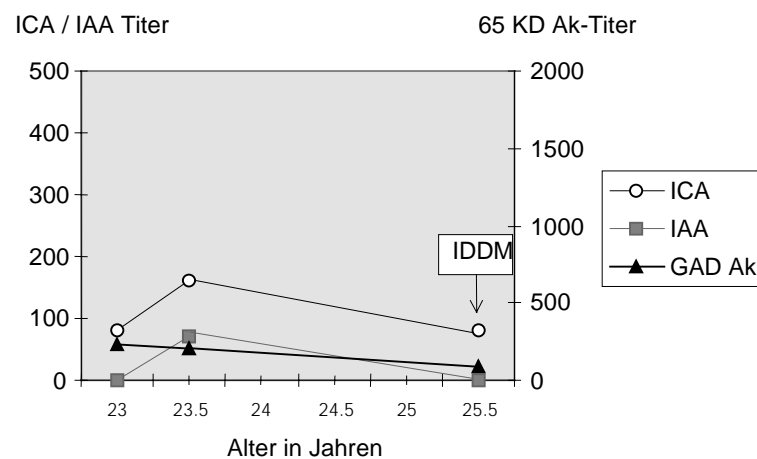


Abb. 11: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patientin Nr. 5 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 25,5 Jahre.

Mit 12 Jahren bei IDDM-Manifestation war der Patient Nr. 6, dessen Titerverlauf in Abbildung 12 dargestellt ist, der jüngste Patient in dieser Untersuchung. Er wies bereits mit 6 und 7,5 Jahren, ebenso wie bei Diagnosestellung hohe Titer von IAA auf (330, 380 und 200 Units). Auch die ICA-Titer waren jeweils deutlich erhöht (160, 80 und 160 JDF units). Im Gegensatz dazu war er von den 8 IDDM-Patienten der einzige, bei dem zu keinem Zeitpunkt 65 KD Ak-Positivität nachgewiesen werden konnte (Index 46, 0 und 10, d. h. jeweils unterhalb des Schwellenwertes).

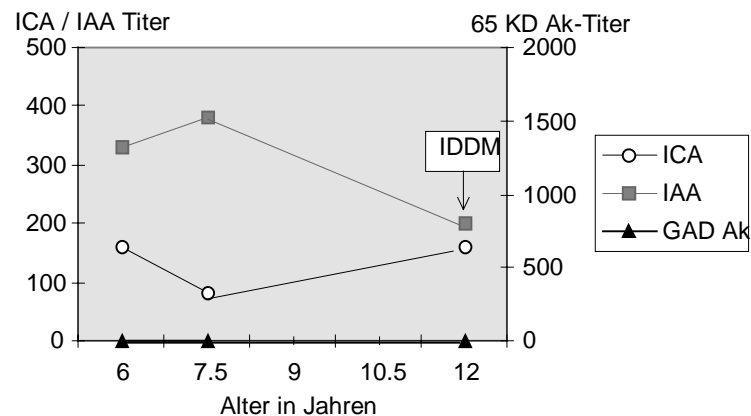


Abb. 12: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patient Nr. 6 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 12 Jahre.

Abbildung 13 zeigt die Patientin Nr. 7, die in der Untersuchung zwei Jahre vor IDDM-Manifestation lediglich 65 KD Ak aufwies, ebenso wie bei Diagnose (Index 183 und 77). IAA-Positivität wurde nur in der Serumprobe bei Diagnose gefunden (35, d. h. unterhalb des Schwellenwertes, und 165 Units). ICA konnten in keiner der beiden Serumproben nachgewiesen werden (0 JDF units).

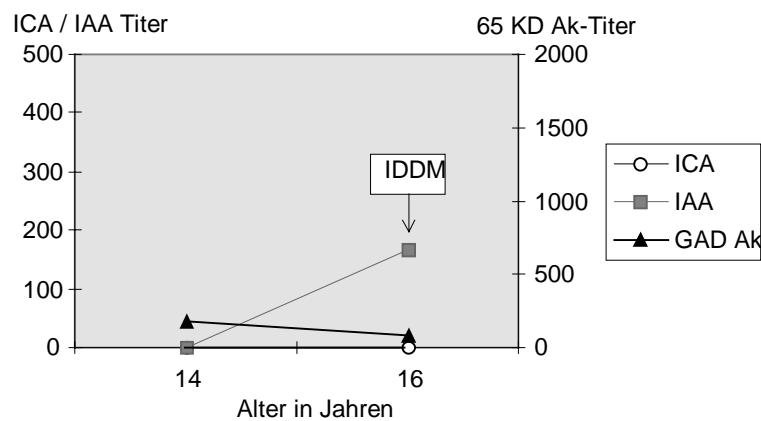


Abb. 13: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patientin Nr. 7 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 16 Jahre.

Bei dem Patienten Nr. 8, dessen Antikörperstatus über einen Zeitraum bis zu 6 Jahren vor Diagnose in Abbildung 14 dargestellt ist, konnten weder ICA noch IAA nachgewiesen werden (jeweils 0 Units). 65 KD Ak-Positivität fand sich ausschließlich bei Manifestation (Index 37, 37, d. h. beide unterhalb des Schwellenwertes, und 115), wobei nicht auszuschließen ist, daß die Serokonversion bereits während der 3 präklinischen, nicht untersuchten Jahre stattgefunden haben könnte.

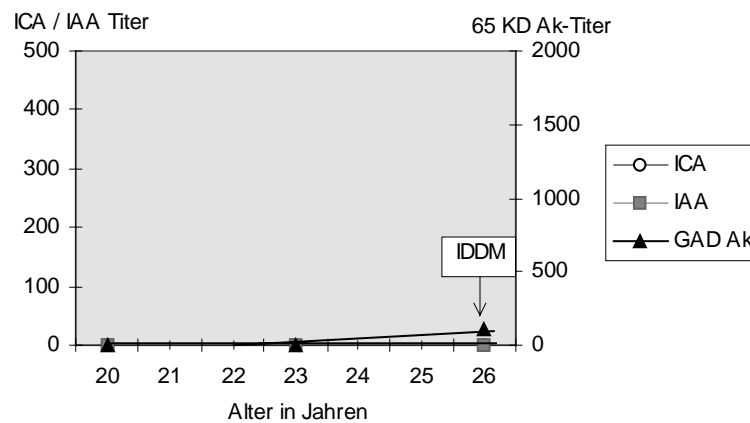


Abb. 14: Titerverlauf von ICA, IAA und 65 KD Ak bei Patient Nr. 8 mit positiver Familienanamnese. Manifestationsalter: 26 Jahre.

4.4 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MARKERKOMBINATIONEN BZW. TITERHÖHE UND IDDM-ERKRANKUNGSRISIKO

Zur Zusammenhangprüfung zwischen dem Erkrankungsrisiko und den Prävalenzraten von IAA bzw. 64 und 65 KD Ak wurden ausschließlich die ersten zur Verfügung stehenden Serumproben der einzelnen Personen berücksichtigt.

Es erfolgte eine Einteilung der Population in die drei folgenden Gruppen:

- 1.) Prädiabetiker, die tatsächlich während des Beobachtungszeitraums manifestierten
- 2.) alle bis Studienende nicht an IDDM erkrankten Personen mit ICA positiven Seren
- 3.) alle bis Studienende nicht an IDDM erkrankten Personen mit ICA negativen Seren

4.4.1 MARKERKOMBINATIONEN

Bei den Prädiabetikern ($n = 8$) lagen die Autoantikörper-Prävalenzen bei 63 % (5/8) für 64 KD Ak, 75 % (6/8) für 65 KD Ak und 75 % (6/8) für IAA. In der Gruppe der Personen mit ICA positiven Seren ohne IDDM ($n = 26$) waren 38 % (10/26) 64 KD Ak positiv, 50 % (13/26) 65 KD Ak positiv und lediglich 19 % (5/26) IAA positiv. Bei den übrigen Personen ohne IDDM und negativem ICA-Titer ($n = 29$) betrugen die Prävalenz für 64 KD Ak 0 % (0/10), für 65 KD Ak 7 % (2/29) und für IAA 0 % (0/29).

Dabei ergab sich im X^2 -Test für 65 KD Ak ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zu den drei genannten Gruppen ($X^2 = 17$; $K = .44$; $p < .001$). Dies traf ebenso zu für IAA ($X^2 = 18$; $K = .45$; $p < .001$). Die 64 KD Ak-Prävalenzen waren signifikant korreliert ($X^2 = 7$; $K = .35$; $p < .01$).

Abbildung 15 zeigt die Prävalenzraten von 64 KD Ak, 65 KD Ak und IAA in den ersten Serumproben der Gruppen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko.

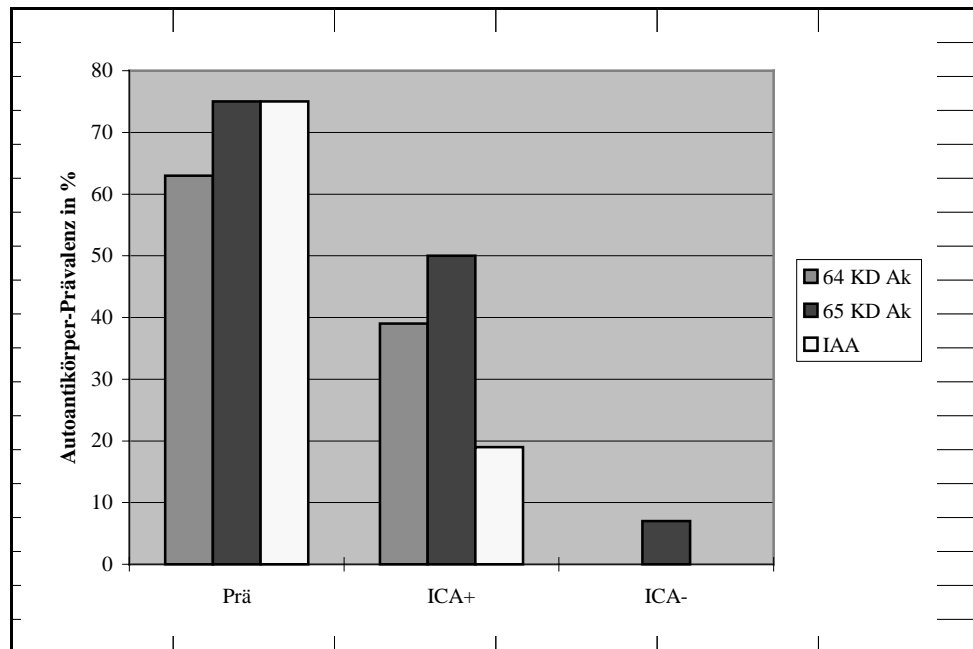


Abb. 15: Prävalenz von 64 KD Ak, 65 KD Ak und IAA bei IDDM-Patienten in der prädiabetischen Phase (Prä), sowie bei Personen ohne IDDM mit ICA positivem (ICA+)- und ICA negativem (ICA-)-Befund

4.4.2 TITERHÖHE

Ein Vergleich der durchschnittlichen Indexwerte der 65 KD Ak bei den drei genannten Risikogruppen zeigte zwischen der Gruppe der Prädiabetiker und den Personen mit positivem ICA-Befund einen tendentiellen Unterschied (Mann-Whitney U-Test: $z = 1.8$; $p < .07$). Die Personen ohne ICA-Nachweis unterschieden sich von den Prädiabetikern hoch signifikant (Mann-Whitney U-Test: $z = 3.4$; $p < .001$), von Personen mit positivem ICA-Befund signifikant (Mann-Whitney U-Test: $z = 2.4$; $p < .05$).

Bei Prädiabetikern ($n = 8$) betrugen die Indexwerte 530 ± 201 SEM, bei den Personen mit ICA positiven Seren ($n = 34$) 362 ± 91 SEM und bei Personen ohne ICA-Nachweis ($n = 29$) 5 ± 15 SEM.

Abbildung 16 zeigt die durchschnittlichen Werte für 65 KD Ak in den ersten Serumproben der Gruppen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko.

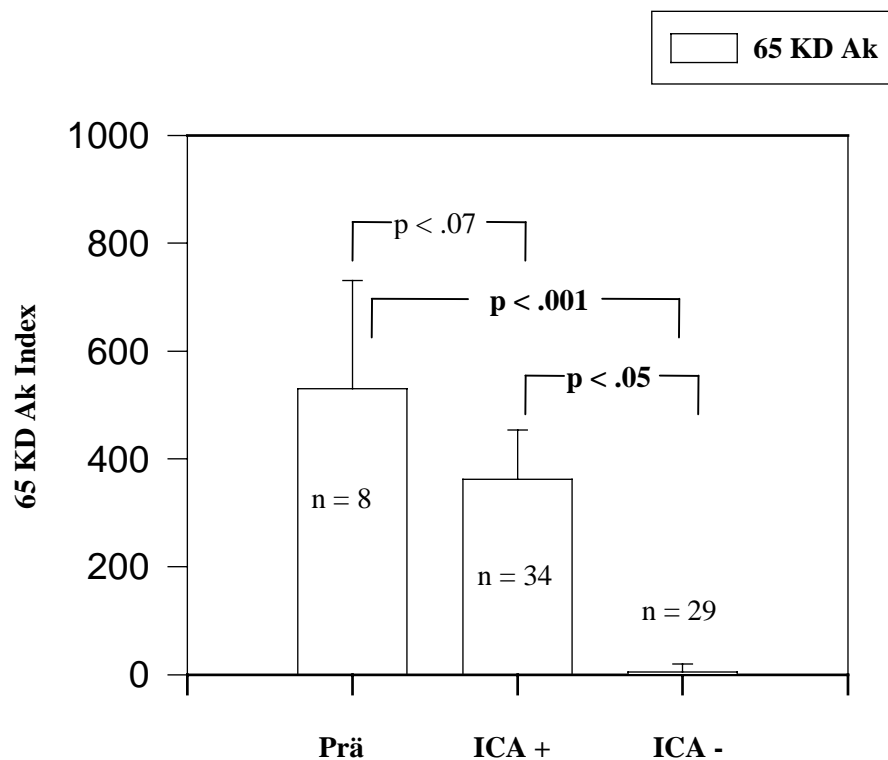


Abb. 16: Durchschnittlicher 65 KD Ak Index (\pm SEM) bei IDDM-Patienten in der prädiabetischen Phase (Prä), sowie bei Personen ohne IDDM mit positivem ICA (ICA+)- und negativem ICA (ICA-)-Befund

Bei den IAA unterschieden sich die Prädiabetiker von beiden anderen Gruppen signifikant (Mann-Whitney U-Test: $z = 2.1$; $p < .05$ bzw. $z = 2.7$; $p < .05$). Zwischen Personen mit und ohne ICA-Nachweis bestand kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U-Test: $z = .1$; $p = \text{n.s.}$).

In der Gruppe der Prädiabetiker ($n = 8$) betrugen die Titer-Durchschnittswerte 262 ± 154 SEM JDF Einheiten, bei Personen mit ICA positiven Seren ($n = 34$) 81 ± 41 und bei Personen mit ICA negativen Seren 2 ± 5 SEM JDF Einheiten.

Abbildung 17 zeigt die durchschnittlichen Werte für IAA in den ersten Serumproben der Gruppen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko.

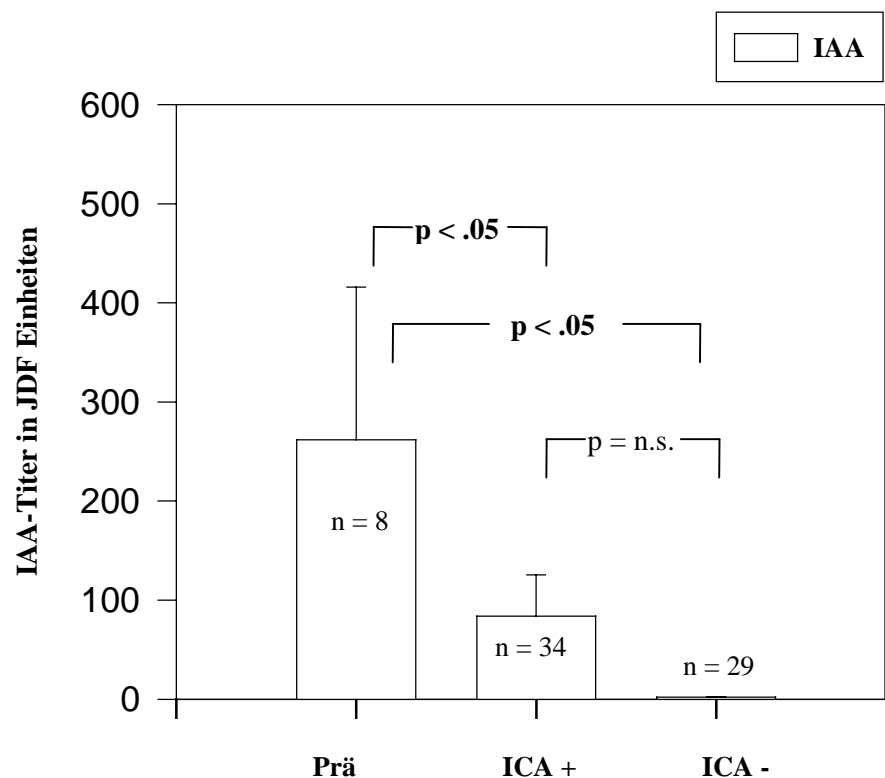


Abb. 17: Durchschnittliche Titerhöhe von IAA (\pm SEM) bei IDDM-Patienten in der prädiabetischen Phase (Prä), sowie bei Personen ohne IDDM mit positivem ICA (ICA+)- und negativem ICA (ICA-)- Befund

IV. DISKUSSION

1. METHODEN DER GAD AK-BESTIMMUNG

Zur Bestimmung von 64 KD Ak wurde der Immunpräzipitationsassay mit anschließender Autoradiographie nach CHRISTIE et al. (1990), entsprechend einer Modifikation von SEISSLER et al. (1992) durchgeführt. Dieser ursprünglich von BAEKKESKOV et al. (1982) angewandte, hoch spezifische und sehr sensitive Immunpräzipitationsassay zur Detektion von 64 KD Ak wies einige Testeigenschaften auf, die seine Anwendbarkeit zu Screening Zwecken erheblich einschränken.

Dies betraf zunächst die Verfügbarkeit von vitalen humanen Langerhansschen Inseln, die von der Transplantationsgruppe der Medizinischen Klinik III und Poliklinik in Gießen aus Pankreata von Organspendern isoliert wurden. Da die Organe nur in begrenztem Umfang zur Verfügung standen und primär der Inseltransplantation dienen sollten, konnten die benötigten Inseln lediglich bei fehlender Verwendbarkeit für eine Transplantation zur 64 KD Antikörperbestimmung bereitgestellt werden. Naturgemäß entstanden dadurch oft sehr lange Latenzen zwischen den einzelnen Testansätzen.

Neben der Vielzahl von konsekutiven Arbeitsschritten und damit potentiellen Fehlerquellen erforderte das Versuchsprotokoll viel Zeit. Nach der dreitägigen Testdurchführung war das Ergebnis, bedingt durch die lange Expositionsdauer des Röntgenfilms, frühestens nach 14 Tagen erhältlich.

Die Verwendung eines Radionuklids mit hoher spezifischer Aktivität verursachte zum einen beachtliche Kosten. Für den Umgang mit der vor allem zu Testbeginn hohen Radioaktivitätsmenge des β -Strahlers ³⁵Schwefel waren zudem entsprechende Strahlenschutzvorkehrungen erforderlich, die an der Klinik nicht gegeben waren und somit einen intermittierenden Ortswechsel an das entfernt gelegene Strahlenzentrum der Universität Gießen zur Folge hatten.

Somit konnte der 64 KD Ak-Assay im Rahmen dieser experimentellen Promotionsarbeit nur an einer limitierten Anzahl von Seren durchgeführt werden. Zur Evaluierung wurden Seren eines negativen und eines positiven Kontrollkollektivs herangezogen. Deren 64 KD Ak-Prävalenzraten von 0 bzw. 64 % waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Immunpräzipitationsversuche von BAEKKESKOV et al. (1992) mit 0 versus 80 % und CHRISTIE et al. (1988) mit 0 versus 73 %.

Aus den zahlreichen oben genannten Gründen wurde der 64 KD Ak-Assay anschließend nicht in das Routine-Diagnostikprogramm des Immunologischen Labors übernommen.

In Anbetracht der Tatsache, daß etwa 90 % aller zukünftig erkrankenden Typ I Diabetiker nicht mit einem IDDM-Patienten verwandt sind und somit nicht in einer der Familienstudien erfaßt werden, werden an prädiabetische Marker vielzählige Anforderungen gestellt. Neben der Validität müssen einfache Durchführbarkeit, Kostengünstigkeit sowie Reproduzierbarkeit des Tests gewährleistet sein um ein Screening großer Bevölkerungsgruppen zu ermöglichen. Für Aussagen über den Verlauf der Erkrankung ist zudem die Quantifizierbarkeit von serologischen Markern bedeutsam.

Von Mitarbeitern des Hagedorn Research Institute in Dänemark wurde etwa zeitgleich mit der vorliegenden Untersuchung ein quantitativer Radioimmunoassay für die Bestimmung von 65 KD Ak entwickelt (PETERSEN et al. 1994). Dieser einfache, reproduzierbare und quantitative Radioligandenassay imponierte durch seine hohe Sensitivität und Korrelation mit den Ergebnissen des Immunpräzipitationsassays.

Eine weitere Vereinfachung durch die Entwicklung von ELISAs und enzymatischen Immunpräzipitationsassays erscheint allerdings schwierig, da dies bisher ausschließlich auf Kosten der Sensitivität gelang, was in den ersten beiden

internationalen GAD-Antikörper-Workshops gezeigt wurde (SCHMIDLI et al., 1994 und 1995). Die verringerte Sensitivität dieser Test beruhte hauptsächlich auf ihrer Unfähigkeit, auch niedrigtitrige GAD Ak in IDDM-Seren nachzuweisen.

Flüssigphasenassays zeigten darüberhinaus bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen - wie bei der Standardkurve eines SMS-Serums - einen Signalabfall, der auf einer inkompletten Antigen-Antikörper-Reaktion beruhte, dem sog. prozone Effekt. Zur Quantifizierung der GAD Ak müßten bei diesen Tests sowohl verdünnte als auch native Serumproben eingesetzt werden.

Western blot und Dot-blot Experimente ergaben eine verminderte Reaktivität von GAD Antikörpern in Seren von Typ I Diabetikern (BAEKESKOV et al., 1990; TUOMI et al., 1994). Dies könnte mit dem Anteil der spezifisch gegen Konformationsepitope der Glutamat Decarboxylase gerichteten Antikörper zusammenhängen (UJIHARA et al., 1994; DAW und POWERS 1995). Sie verlieren ihre Bindungsfähigkeit bei einer Proteindenaturierung im Western blot, ebenso wie bei einer Konformationsänderung durch Immobilisierung auf Nitrocellulosepapier im Dot-blot. Aufgrund dieser testimmanenten Eigenschaften sind beide Verfahren für die GAD-Bestimmung beim IDDM ungeeignet.

Als Goldstandard Methode zur Bestimmung von GAD Ak konnte sich letztlich der Radioimmunoassay etablieren.

2. KORRELATION DER GAD AK ZU ICA UND IAA

ICA werden im Rahmen von Interventionsstudien als serologische Indikatoren für das Risiko, an einem IDDM zu erkranken, herangezogen. 43 % der Verwandten 1. Grades mit einem ICA-Titer von 10 JDF Units oder mehr werden innerhalb von 10 Jahren einen IDDM entwickeln. Bei 20 und mehr JDF Units steigt dieses Risiko sogar auf 53 % an (BINGLEY et al., 1994). Da der Immunfluoreszenz Test bereits seit über 20 Jahren weitverbreitet eingesetzt wird, liegen die meisten Daten zu diesem etablierten Marker vor, an dem alle weiteren Marker gemessen werden müssen. Der Nachweis von ICA in der vorliegenden Studie erfolgte ebenfalls durch einen indirekten Immunfluoreszenztest auf Kryostatschnitten von menschlichem Pankreas-gewebe (BECKER et al., 1988 und 1989a).

Übereinstimmend mit ATKINSON et al. (1990) und SEISSLER et al. (1992) fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen GAD Ak und ICA.

Da ein Teil der ICA gegen Glutamat Decarboxylase gerichtet ist und somit GAD Ak zur ICA-Reaktivität beitragen (ATKINSON et al., 1993; SCHERBAUM 1994), war der Anteil an übereinstimmend positiven Seren erwartungsgemäß hoch.

Kompetitions- und Absorptionsstudien mit Seren von IDDM-Patienten zeigten, daß ICA-Positivität ohne Nachweis von GAD Ak überwiegend auf ICA512 / IA-2 Antikörpern beruht (MYERS et al., 1995; LAN et al., 1996), die hier nicht bestimmt wurden, wahrscheinlich aber ebenfalls für die ICA positiven, GAD Ak negativen Seren verantwortlich sein dürften.

Für die einzelnen GAD Ak positiven, jedoch ICA negativen Seren, können verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden. Zum einen könnte postuliert werden, daß GAD-Antikörpertiter, die im Immunpräzipitationsassay gemessen werden, unterhalb der Detektionsgrenze des weniger sensitiven Immunfluoreszenztests liegen und deshalb keine ICA-Reaktivität anzeigen können (MYERS et al., 1995). Andererseits sind vermutlich bestimmte GAD-Epitope des gefalteten Proteins in Pankreasgefrierschnitten für ICA unzugänglich und tragen damit ebenfalls zur mangelnden ICA-Bindung bei GAD positiven Seren bei (AUGSTEIN et al., 1996).

Autoantikörper gegen Insulin (IAA) sind ebenfalls stark mit dem Typ I Diabetes assoziiert. Als Methode zur IAA-Bestimmung wurde ein kompetitiver Radioimmunoassay angewandt (PALMER et al., 1983). Ihre Korrelation zu GAD Ak war signifikant, analog der Ergebnisse von ATKINSON et al. (1990) und SEISSLER et al. (1992). Bei Verwandten von Typ I Diabetikern mit ICA positiven Seren führte der Nachweis von IAA zwar zu einer signifikanten Erhöhung des kumulativen 10-Jahres-Erkrankungsrisikos auf 84 % (BINGLEY et al., 1994). Die damit verbundene Sensitivitätsabnahme schränkt jedoch ihren Wert als prädiktiver Marker für den IDDM wieder ein.

3. EINFLUSS VON ALTER, GESCHLECHT UND ZEITVERLAUF AUF GAD AK

Beim Vergleich der Antikörper-Prävalenzraten in den ersten 5 Lebensdekaden, auf die die 75 untersuchten Personen gemäß ihres Alters bei der ersten Serumuntersuchung aufgeteilt wurden, ergab sich ein heterogenes Muster.

Eine signifikant erhöhte Antikörper-Prävalenz fand sich ausschließlich für die 65 KD Ak in den jüngeren Lebensjahren ($p < .05$). Die Prävalenzraten der ICA lagen zwischen 45 und 53 % und blieben damit - im Gegensatz zu denen aller anderen Antikörper - ausgesprochen stabil während der ersten fünf Lebensdekaden. Obwohl IAA in dieser Querschnittsuntersuchung ausschließlich bei Personen unter 28 Jahren nachgewiesen werden konnten, ergab sich statistisch lediglich ein tendentieller Altersunterschied ($p = .06$), da die Prävalenzraten auch in den ersten drei Lebensdekaden mit jeweils weniger als 35 % sehr niedrig lagen.

Zu diesen Ergebnissen konnten in der Literatur keine direkt vergleichbaren Daten gefunden werden. Vielmehr bezogen sich Alterskorrelationen meist auf das Alter bei IDDM-Manifestation. Bis zu einem Alter von 30 Jahren bei Diabetesbeginn waren ICA und GAD Ak deutlich häufiger nachweisbar (62 bzw. 80 %) als bei höherem Manifestationsalter (28 bzw. 52 %) (PETERSEN et al., 1994). Bei den IAA war die Prävalenzrate bei Diabetesbeginn vor der Pubertät deutlich erhöht (VARDI et al., 1987) und am höchsten bei Patienten, die jünger als 5 Jahre alt waren (PALMER et al., 1983).

Zwischen Männern und Frauen bestand bei keinem der untersuchten Antikörper ein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. der Prävalenzen.

Bei den ICA, die in der Querschnittsuntersuchung zu 51 % (20/39) bei Männern und zu 44 % (16/36) bei den Frauen nachgewiesen werden konnten, wurde ein analoges Ergebnis von LANDIN-OLSSON et al. (1989) beschrieben.

Betrachtet man die gegen GAD gerichteten Antikörper, so überwog die Antikörper-Positivität sowohl der 64 KD Ak, als auch der 65 KD Ak bei den Frauen mit 63 bzw. 42 % im Gegensatz zu den Männern mit 34 bzw. 28 %.

Ein umgekehrtes Verhältnis fand sich bei den IAA mit einem positiven Befund bei 23 % der Männer gegenüber nur 11 % der Frauen. Diese Tendenzen wurden auch in einer Studie von ZIMMET et al. (1994) beobachtet mit GAD Antikörpern bei 88 % der Frauen versus 71 % der Männer bzw. IAA bei 82 % der Männer und lediglich 60 % der Frauen.

Diese geringfügigen Unterschiede in der Häufigkeit der verschiedenen Antikörper bei beiden Geschlechtern, sowie die Tatsache, daß Männer und Frauen etwa gleich häufig an einem IDDM erkranken (CLASSEN et al. 1991), sprechen eher gegen unterschiedliche pathologische Mechanismen der Krankheitsentstehung bei Männern und Frauen.

In den Verlaufsuntersuchungen bei Personen, von denen drei sequentielle Proben untersucht wurden, zeigte sich die höchste Fluktuationsrate bei den ICA mit 25 % der Seren, die entweder von negativ nach positiv oder umgekehrt konvertierten bzw. Seren mit intermittierender ICA-Positivität. Diese Beobachtung deckt sich prinzipiell mit denen von SPENCER et al. (1984) und SEISSLER et al. (1992) über fluktuierende ICA-Befunde. Im Vergleich zu den Resultaten der Bevölkerungsstudie von SEISSLER wurden allerdings in der vorliegenden Studie wesentlich geringere Prozentzahlen gefunden, sowohl bei dem Anteil der lediglich intermittierend ICA positiven Seren mit 4 % versus 33 %, als auch bei den nur zu Beginn ICA positiven Seren mit 12 % versus 22 %.

Für IAA wurden mit 22 % etwa vergleichbar häufig variierende Ergebnisse im Verlauf festgestellt.

Demgegenüber war die hohe Konstanz von positiven ebenso wie negativen Befunden bei den gegen GAD gerichteten Antikörpern auffällig. 64 KD Ak variierten lediglich in 3 %, 65 KD Ak in 12 %. Weitere für 64 KD und 65 KD Ak vorliegende Verlaufsuntersuchungen (SEISSLER et al. 1992, LÜHDER et al. 1994) bestätigen diese Tendenz.

Die statistische Überprüfung einer Abhängigkeit zwischen den seriellen Antikörperuntersuchungen zeigte für die vier gemessenen Antikörper jeweils hohe statistische Signifikanz.

Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse wird eine hohe Persistenz sowohl der 64 als auch der 65 KD Ak deutlich, im Gegensatz zu den ICA und IAA.

Die unterschiedliche Reihenfolge, in der die Antikörper nachweisbar waren, wird im nächsten Kapitel diskutiert werden.

4. EVALUIERUNG VON GAD AK, ICA UND IAA HINSICHTLICH DEREN PRÄDIKTION UND PRÄVENTION DES IDDM

Bei den acht Prädiabetikern (5 Männer, 3 Frauen, durchschnittliches Alter 18 Jahre bei der erstmaligen Serumuntersuchung), die bis zum Zeitpunkt der Diagnose ihres IDDM untersucht wurden (durchschnittlicher Beobachtungszeitraum 37 Monate, Spannweite 8 - 77 Monate), konnten in 75 % (6/8) ICA, sowie IAA und 65 KD Ak gemessen werden. Ein übereinstimmender Nachweis von 64 KD Ak und 65 KD Ak gelang bei 5 Prädiabetikern. In dem Serum von Patient Nr. 7, das den niedrigsten GAD-Indexwert aufwies, lagen 64 KD Ak unter der Nachweisgrenze, so daß deren Prävalenz bei den Prädiabetikern lediglich 63 % (5/8) betrug.

Die Prävalenz der 65 KD Ak wäre möglicherweise noch höher, wenn bei Patient Nr. 8 weitere Serumuntersuchungen in kürzeren Intervallen durchgeführt worden wären. Da von den drei ausgewählten Seren 6 und 3 Jahre vor bzw. bei Diagnose lediglich letzteres 65 KD Ak positiv war, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Serokonversion noch während der 3 letzten präklinischen Jahre stattfand.

Eine ähnliche Überlegung betrifft Patientin Nr. 7, deren Serum bei Diagnosestellung - 2 Jahre nach der letzten präklinischen Untersuchung - erstmals IAA-Positivität aufwies.

Nicht zuletzt für die Detektion von Autoantikörpern bei derartigen Einzelpersonen, bei denen eine Serokonversion kurze Zeit vor Diagnosestellung postuliert werden kann, erscheinen halbjährliche Intervalle zwischen den einzelnen Folgeuntersuchungen von großer Bedeutung um möglicherweise einen absoluten Insulinmangel durch präventive Therapiemaßnahmen verhindern zu können. Zur Durchführung von Screeninguntersuchungen mit einer derartig hohen Frequenz sind einfach durchzuführende, kostengünstige und sehr sensitive Tests unerlässlich.

ICA und IAA konnten in der vorliegenden Studie bis zu 77 Monate, entsprechend knapp 6,5 Jahren vor Diagnosestellung nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu erstrecken sich die Angaben zu ICA in der Literatur über eine Spannweite von 30

Monaten (GORSUCH et al. 1981) bis 8,5 Jahre vor Diagnose (BINGLEY et al. 1994). Bei den IAA reichen die Angaben von BINGLEY et al. (1994) ebenfalls mit 8,5 Jahren am weitesten vor den Diagnosezeitpunkt zurück bei dem männlichen Verwandten eines Typ I Diabetikers, bei dem aber gleichzeitig bereits ICA und GAD Ak nachgewiesen werden konnten.

64 KD Ak und 65 KD Ak fanden sich in dem hier untersuchten Kollektiv bis zu 47 Monate vor IDDM-Manifestation. Andere Autoren beschrieben GAD Antikörper sogar 64 bis 122 Monate, also mehr als 10 Jahre vor Manifestation und damit früher als die Marker ICA und IAA (KAUFMAN et al. 1992, ATKINSON et al. 1990, BAEKKESKOV et al. 1987, BINGLEY et al. 1994, LÜHDER et al. 1994).

Bei allen untersuchten Personen, in deren Seren zu verschiedenen Zeitpunkten GAD Ak und ICA bzw. IAA gefunden wurden, gelang der Nachweis von GAD Antikörpern früher als der von ICA und/oder IAA. Bei Personen mit ICA positiven Seren wurden GAD Ak in 7,7 % (3/39) zwei bis vier Jahre vor ICA gefunden. Bei Personen mit IAA positiven Seren konnten GAD Ak in 23,5 % (4/17) etwa zwei Jahre vor IAA gemessen werden.

Neben der vorliegenden wurde auch bei anderen Studien beobachtet, daß 64 bzw. 65 KD Ak vor ICA und IAA und teilweise sogar bis einschließlich des Diagnosezeitpunktes als einzige pankreasspezifische Autoantikörper nachweisbar sind (BÄRMEIER et al., 1991). Das Auftreten von GAD Antikörpern wurde beispielsweise auch von LÜHDER et al. (1994) bis zu 46 Monate vor ICA beschrieben. Somit dürfte es sich um einen Marker handeln, der bereits in sehr frühen Krankheitsstadien dazu geeignet ist, das Ablaufen eines pankreasspezifischen Autoimmunprozesses anzuzeigen.

Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 64 KD Ak und einer im intravenösen Glucosetoleranztest ersichtlichen progressiven Beta-Zell-Dysfunktion festgestellt werden, der die Vermutung nahelegen könnte, daß 64 KD Ak bessere Marker für die Krankheitsprogression seien als ICA und IAA (BÄRMEIER et al. 1991). Da andererseits aber auch bei einzelnen IDDM-Patienten mit ICA und/oder IAA positiven Seren zu keinem Zeitpunkt GAD Autoantikörper

nachgewiesen werden konnten, beträgt auch hier die Prädiktion weniger als 100 %. Mögliche Erklärungen für den fehlenden Nachweis von GAD Antikörpern wäre eine überwiegende T-Zell-Aktivierung ohne spezifische GAD Ak-Produktion oder eine gegen andere Beta-Zell-Autoantigene gerichtete Immunantwort (ZIMMET et al. 1994).

Keiner der bisher identifizierten immunologischen, aber auch genetischen und metabolischen Marker konnte bisher alleine einen IDDM sicher prognostizieren. Die Bedeutung der GAD Autoantikörper könnte dabei vor allem bei Personen mit niedrigtitrigen ICA (BINGLEY et al., 1994) und bei ICA/IAA negativen Seren liegen. Die Untersuchung von BINGLEY et al. (1994) legt darüber hinaus nahe, daß das Risiko für einen IDDM mit der Anzahl positiver Autoantikörper-Nachweise steigt, so daß in Zukunft Markerkombinationen zur Prädiktion genutzt werden.

Die Folgerung von YU et al. (1994), die er aus den Ergebnissen zweier verschiedener GAD-Assays ableitete, daß die Höhe der GAD-Antikörpertiter eine inverse Beziehung zum Erkrankungsrisiko definiere, wurde in der vorliegenden Studie nicht bestätigt. Vielmehr scheinen sowohl höhertitrige GAD Ak als auch IAA mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert zu sein (EISENBARTH et al. 1992, ZIEGLER et al. 1989).

Der von PETERSEN et al. (1994) publizierte einfache, reproduzierbare und quantitative Radioligandenassay ermöglicht nun ein Screening größerer Populationen und wird deshalb in folgenden prospektiven Studien weitere Aussagen über den wahren prädiktiven Wert dieses Markers erlauben.

Neuere Untersuchungen zeigen, daß die Bestimmung von GAD Ak und IA-2 Autoantikörpern die herkömmliche, aufwendige ICA-Bestimmung ersetzen könnten (SEISSLER et al., 1996), möglicherweise sogar durch deren gleichzeitige Messung in einem kombinierten Radioimmunoassay (WIEST-LADENBURGER et al., 1997).

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden zunächst zur Bestimmung von Glutamat Decarboxylase (GAD) Antikörpern zwei Methoden miteinander verglichen. Der ursprüngliche Immunpräzipitationsassay mit Autoradiographie von CHRISTIE et al. (1990) wurde gemäß einer Modifikation von SEISSLER et al. (1992) erstmalig in der Medizinischen Klinik III und Poliklinik Gießen etabliert und zur Untersuchung von insgesamt 128 Seren auf 64 KD Ak herangezogen. Die Bestimmung von 65 KD Ak, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, wurde durch die zwischenzeitliche Entwicklung eines Radioimmunoassays durch PETERSEN et al. (1994) ermöglicht und bei 187 Seren durchgeführt.

Darüberhinaus erfolgte die Charakterisierung der GAD Ak im Vergleich zu den lange bekannten IDDM-Markern ICA und IAA, deren Vorhandensein in den 187 Seren mittels Immunfluoreszenztest, beziehungsweise Radioimmunoassay überprüft wurde. Neben Alters-, Geschlechtsabhängigkeit und Zeitverlauf in sequentiellen Proben einzelner Personen wurde die Bedeutung der GAD Ak als serologische Marker der präklinischen Phase untersucht, da eine möglichst frühzeitige und sichere Prädiktion die Voraussetzung für eine gezielte präventive Behandlung darstellt. Dafür wurden zusätzlich Prävalenz und Titerhöhe der Antikörper bei drei Gruppen mit unterschiedlichem Erkrankungsrisiko verglichen: diagnostisch gesicherte Prädiabetiker, die im Verlauf der Untersuchung tatsächlich einen IDDM entwickelten; Personen ohne IDDM mit ICA positiven Seren; Kontrollpersonen mit ICA negativen Seren.

Die genannten Seren stammten von 75 Personen, die überwiegend im Rahmen einer prospektiven Familienstudie in halbjährlichen Abständen klinisch kontrolliert und serologisch auf das Vorhandensein von ICA und IAA getestet wurden, wobei für Verlaufsuntersuchungen der vorliegenden Studie maximal drei Proben pro Person mit einem Intervall von 2-3 bzw. 5-6 Jahren ausgewählt wurden. Die

Zusammensetzung bestand aus 12 Typ I Diabetikern, wovon bei acht ebenfalls prädiabetische Serumproben vorhanden waren, außerdem 34 Personen ohne IDDM mit ICA positiven Seren und 29 Kontrollpersonen mit ausschließlich ICA negativen Seren.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In der Kontrollpopulation fanden sich in keinem der untersuchten Seren (0/10) 64 KD Ak. 65 KD Ak wurden in 7 % (2/29) nachgewiesen. Hingegen waren 64 % (7/11) der Seren von Diabetikern bei Manifestation 64 KD Ak positiv und 83 % (10/12) wiesen 65 KD Ak auf.

Die Korrelation zwischen 64 KD Ak und 65 KD Ak war bei der Gesamtzahl der ersten verfügbaren und mit beiden Tests überprüften Seren hoch signifikant ($n = 55$; $p < .001$).

Für serologische Screeninguntersuchungen auf GAD Ak erwies sich jedoch der 64 KD Ak-Assay als ungeeignet, da die Verfügbarkeit von humanen Langerhansschen Inseln als Antigenquelle limitiert und die gesamte Durchführung sehr kosten- und zeitintensiv war, nicht zuletzt aufgrund der Verwendung eines hochaktiven Radionuklids. Zudem lagen die Ergebnisse, bedingt durch die lange Expositionszeit des Röntgenfilms, erst frühestens nach 2,5 Wochen vor.

Wesentlich besser eignete sich der 65 KD Ak-Radioimmunoassay, der inzwischen als Standardmethode etabliert ist. Vorteilhaft sind insbesondere seine einfache Durchführbarkeit innerhalb von zwei Tagen mit rekombinanter GAD und geringerer Radioaktivitätsmenge, sowie die Quantifizierbarkeit der Ergebnisse.

2. Beim Vergleich der neuen mit den lange bekannten Markern ICA und IAA zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation von 65 KD Ak mit ICA ($p < .001$). Der Zusammenhang zwischen 65 KD Ak und IAA war ebenso wie zwischen 64 KD Ak und ICA bzw. IAA signifikant ($p < .05$).
3. Die Prävalenzraten der 64 KD Ak, 65 KD Ak, ICA und IAA waren weder alters- noch geschlechtsabhängig.

Die hohen Fluktuationsraten der Antikörper-Positivität von ICA mit 25 % (13/51) und IAA mit 22 % (7/32) gegenüber lediglich 12 % (6/51) bei 65 KD Ak und 3 % (1/30) bei 64 KD Ak deuteten auf eine tendentiell stärkere Persistenz der GAD Ak. Statistisch zeigte sich jedoch eine hoch signifikante intraindividuelle Abhängigkeit bei allen vier Parametern ($p < .001$).

Weder ICA noch IAA konnten in sequentiellen Serumproben vor den beiden GAD Ak nachgewiesen werden. Hingegen wurden letztere in 7,7 % (3/39) vor ICA und in 23,5 % (4/17) vor IAA gefunden.

4. Während der präklinischen Phase betrug bei den acht Prädiabetikern die Prävalenz der 64 KD Ak 63 % (5/8), der 65 KD Ak, ICA und IAA jeweils 75 % (6/8).

Bei Kategorisierung der Gesamtpopulation nach klinischen Kriterien und ICA-Befund in Prädiabetiker, gesunde ICA positive und ICA negative Kontrollpersonen ergab sich ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen 65 KD Ak- bzw. IAA-Positivität und den drei Kategorien ($p < .001$). Die Zusammenhangsprüfung für 64 KD Ak war signifikant ($p < .01$). Mit zunehmendem Erkrankungsrisiko wurde zudem ein Anstieg der Antikörpertiter von 65 KD Ak und IAA beobachtet.

Aus den genannten Ergebnissen ist abzuleiten, daß GAD Antikörper wertvolle serologische Marker für die Identifizierung der prädiabetischen Phase des IDDM sind, da sie teilweise als einzige Marker des Prädiabetes oder mehrere Jahre vor ICA und IAA nachgewiesen werden konnten. Sie könnten als Entscheidungshilfe für frühzeitige therapeutische Interventionen und damit der potentiellen Verhinderung des Ausbruchs der Erkrankung dienen.

Der 65 KD Ak-RIA von PETERSEN et al. (1994) eignet sich besser zum Screening als der Immunpräzipitationsassay mit Autoradiographie. Für die Untersuchung größerer Bevölkerungsgruppen allerdings wäre eine weitere Vereinfachung der Nachweismethode durch die Entwicklung eines ELISAs wünschenswert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Aguilar-Diosdado M, Parkinson D, Corbett J A, Kwon G, Marshall C A, Gingerich R L, Santiago J V, McDaniel M L (1994) Expression of Carboxypeptidase-H and insulin but not glutamate decarboxylase on the β -cell surface. *Diabetes* 43: 418-25
- Assan R, Feutren G, Sirmai J, Boitard C, Vexiau P, Rostu H D, Rodier M, Vague P, Hors J, Bach J F (1990) Plasma C-peptide levels and clinical remissions in recent onset type I diabetic patients treated with cyclosporin and insulin. *Diabetes* 39: 768-74
- Atkinson M A, MacLaren N K, Riley W J, Winter W E, Fisk D D, Spillar R P (1986) Are insulin autoantibodies markers for insulin-dependent diabetes mellitus? *Diabetes* 35: 894-8
- Atkinson M A, Maclaren N K, Scharp D W, Lacy P E, Riley W J (1990) 64 000 M_r autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 335: 1357-60
- Atkinson M A, Holmes L A, Scharp D W, Lasy P E, Maclaren N K (1991) No evidence for serological autoimmunity to islet cell heat shock proteins in insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 87: 721-4
- Atkinson M A, Kaufman D L, Newman D, Tobin A J Maclaren N K (1993) Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 91: 350-6
- Augstein P, Schlosser M, Ziegler B, Hahmann J, Mauch L, Ziegler M (1996) Comparison of the islet cell antibody pattern of monoclonal glutamic acid decarboxylase antibodies recognizing linear and conformational epitopes. *Acta histochem* 98: 229-41
- Baekkeskov S, Nielsen J H, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-9

- Baekkeskov S, Landin M, Kristensen J K, Srikanta S, Bruining G J, Mandrup-Poulsen T, De Beaufort C, Soeldner J S, Eisenbarth G, Lindgren F, Sundquist G, Lernmark A (1987) Antibodies to a 64,000 M_r human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 79: 926-34
- Baekkeskov S, Aanstoot H J, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P (1990) Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-6
- Baisch J M, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra J D (1990) Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 322: 1836-82
- Bärmeier H, McCulloch D K, Neifing J L, Warnock G, Rajotte R V, Palmer J P, Lernmark A (1991) Risk for developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and the presence of islet 64K antibodies. *Diabetologia* 34: 727-33
- Becker F, Schneider-Waterberg J, Walter U, Seggewiss C, Sauer H, Helmke K, Federlin K (1987) Organspezifische Autoantikörper bei Familienmitgliedern von Typ-I-Diabetikern. *Akt Endokrinol Stoffw* 8: 69
- Becker F, Helmke K, Bretzel R G, Seggewiss K, Sauer H, Federlin K (1988) Inselzell-(ICA); Insulin-(IAA) und andere Autoantikörper bei Typ-I-Diabetikern und ihren Familien: Prävalenz und klinische Korrelation. *Gesellschaft für Innere Medizin* 94: 1-6
- Becker F, Buschler H, Scherer S, Sauer H, Bretzel R G, Federlin K (1989a) Inselzellantikörper als Marker des Verlustes der endogenen Insulinreserven bei Typ-I-Prädiabetes. *Akt Endokr Stoffw* 10: 81
- Becker F, Helmke K, Seggewiss K, Sauer H, Federlin K (1989b) Inselzell (ICA)- und Insulin (IAA)- sowie andere Autoantikörper als Marker der Autoimmunität von Typ-I-Diabetikern und ihren Verwandten 1. Grades. *Akt Endokr Stoffw* 10: 37-41
- Bingley P J, Christie M R, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte M T, Bottazzo G F, Gale E A M (1994) Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-10

- Boehm B O, Manfras B, Seissler J, Schöffling D, Glück M, Holzberger G, Seidl S, Kühnl P, Trucco M, Scherbaum W A (1991) Epidemiology and immunogenetic background of islet cell antibody-positive non-diabetic schoolchildren. The Ulm-Frankfurt population study. *Diabetes* 40: 1435-9
- Bonifacio E, Bingley P J, Shattock M, Dean B M, Dunger D, Gale E A M, Bottazzo G F (1990) Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* I: 147-9
- Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E (1995) Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-26
- Bottazzo G F, Florin-Christensen A., Doniach D (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1279-83
- Bougneres P F, Landais P, Boisson P, Carel C J, Boitard C, Chaussin L J, Bach J F (1990) Limited duration of remission of insulin dependency in children with recently diagnosed type I diabetes treated with low dose cyclosporin A. *Diabetes* 39: 1264-72
- Bretzel R G, Hering B J, Federlin K F (1995) Islet cell transplantation in diabetes mellitus - from bench to bedside. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 Suppl 2: 143-59
- Bruining G J, Molenaar J L, Grobbee D E, Hofman A, Scheffer G J, Bruining H A, DeBruin A M, Valkenburg H A (1987) Ten-year follow-up study of islet cell antibodies and childhood diabetes mellitus. *Lancet* I: 1100-3
- Bu D F, Erlander M G, Hitz B C, Tillakaratne N J K, Kaufman D L, Wagner-McPherson C B, Evans G A, Tobin A J (1992) Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2115-9
- Chang Y C, Gottlieb D I (1988) Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Neurosci* 8: 2123-30
- Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot H J, Aagaard L, Begley K, Kofod H, Hejnaes K, Baekkeskov S (1991) Pancreatic β cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa

- amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem* 266: 21257-64
- Christgau S, Aanstoot H J, Schierbeck H, Begley K, Tullin S, Hejnaes K, Baekkeskov S (1992) Membrane anchoring of the autoantigen GAD₆₅ to microvesicles in pancreatic β -cells by palmitoylation in the NH₂-terminal domain. *J Cell Biol* 118: 309-20
- Christie M R, Landin-Olsson, Sundkvist G, Dahlquist, Lernmark A, Baekkeskov S (1988) Antibodies to a M_r-64 000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 31: 597-602
- Christie M R, Pipeleers D G, Lernmark A, Baekkeskov S (1990) Cellular and subcellular localization of an Mr 64,000 protein autoantigen in insulin-dependent diabetes. *J Biol Chem* 265: 376-81
- Christie M R, Brown T J, Cassidy D (1992) Binding of antibodies in sera from type (insulin-dependent) diabetic patients to glutamate decarboxylase from rat tissues. Evidence for antigenic and non-antigenic forms of the enzyme. *Diabetologia* 35: 380-4
- Christie M R, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown T J, Lai M, Bonifacio E, Bottazzo G F (1994) Antibodies to islet 37K antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43: 1254-9
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K (1991) *Lehrbuch Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore: 779-82
- Colman P G, Nayak R C, Campbell I L, Eisenbarth G S (1988) Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes* 37: 645-52
- Cram D S, Faulkner J B, Kun J, Harrison L C (1995) Glutamic acid decarboxylase-67 (GAD67): expression relative to GAD65 in human islets and mapping of autoantibody epitopes. *Endocrinol* 136: 111-9
- Daw L, Powers A C (1995) Two distinct glutamic acid decarboxylase auto-antibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 44: 216-20

- Daw K, Ujihara N, Atkinson M, Powers A C (1996) Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition. *J Immunol* 156: 818-25
- DeAizpurua H J, Honeyman M C, Harrison L C (1992) A 64 kDa antigen/glutamic acid decarboxylase (GAD) in fetal pig pro-islets: co-precipitation with a 38 kDa protein and recognition by T cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 5: 759-70
- Dean B M, Becker F, McNally J M, Tarn A C, Schwartz G, Gale E A M, Bottazzo G F (1986) Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet-cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 29: 339-42
- Eisenbarth G S, Jackson R A, Pugliese A (1992) Insulin autoimmunity: the rate limiting factor in pre-type 1 diabetes. *J Autoimmun* 5(A): 241-6
- Elliott R B, Chase H P (1993) Prevention or delay of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. *Diabetologia* 34: 362-5
- Erdö S L, Wolff J R (1990) γ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem* 54: 363-72
- Erlander M G, Tillakaratne N J K, Feldblum S, Patel N, Tobin A J (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100
- Erlander M G, Tobin A J (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16: 215-26
- Federlin K, Helmke K, Becker F, Seggewiss K, Sauer H (1987) Organspezifische Autoantikörper bei Typ-I-Diabetikern und deren Verwandten 1. Grades. *Mü Med Wschr* 37: 635-8
- Federlin K, Florack G, Hopt U T, Land W, Landgraf R, Mehnert H (1990) Indikationen für die Pankreastransplantation. *Langenbecks Arch Chir* 375: 186-91
- Federlin K, Becker F (1990) Specific therapeutic attempts in experimental and clinical type-I diabetes. *Klin Wochenschr* 68 Suppl 21: 38-43
- Federlin K, Hering B, Bretzel R G (1992) Islet transplantation: clinical and experimental. *Horm Metab Res Suppl* 26: 148-51

- Federlin K (1993) Islet transplantation. The connection of experimental and clinic exemplified by the transplantation of islets of Langerhans. *Exp Clin Endocrinol* 101: 334-45
- Gale E A (1996) Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM: the role of nicotinamide. *Horm Res* 45 Suppl 1: 39-43
- Garry D J, Sorensen R L, Elde R P, Madsen A (1986) Immunohistochemical co-localization of GABA and insulin in β -cells of rat islets. *Diabetes* 35: 1090-5
- Genovese S, Bonifacio E, McNally J M, Dean B M, Wagner R, Bosi E, Gale E A M, Bottazzo G F (1992) Distinct cytoplasmic islet cell antibodies with different risks for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 385-8
- Gepts W (1965) Pathological anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14: 619-33
- Gianani R, Pugliese A, Bonner-Weir S, Shiffrin A J, Soeldner J S, Erlich H, Awdeh Z, Alper C A, Jackson R A, Eisenbarth G S (1992) Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 41: 347-53
- Giorda R, Peakman M, Tan K C, Vergani D, Trucco M (1991) Glutamate decarboxylase expression in islets and brain. *Lancet* 338: 1469-70
- Gorsuch A NGF, Spencer K M, Lister J, McNally J M, Dean B M, Bottazzo G F, Cudworth A G (1981) Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 1363-5
- Griffin A C, Zhao W, Wegmann K W, Hickley W F (1995) Experimental autoimmune insulinitis. Induction by T lymphocytes specific for a peptide of proinsulin. *Am J Pathol* 147: 845-57
- Hagopian W A, Michelsen B, Karlsen A E, Larsen F, Moody A, Grubin C E, Rowe R, Petersen J, Mcevoy R, Lernmark A (1993) Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M_r isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 42: 631-6
- Harrison L C, Campbell I L, Colman P G et al. (1990) Type I diabetes: immunopathology and immunotherapy. *Adv Endocrinol Metab* 1: 35-94
- Harrison L C, De Aizpurua H, Loudovaris T, Campbell I L, Cebon J S, Tait B D, Colman P G (1991) Reactivity to human islets and fetal pig proislets by

- peripheral blood mononuclear cells from subjects with preclinical and clinical insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 40: 1128-33
- Hirata Y, Ishizu H, Ouchi NGF, Motomura S, Abe M, Hara Y, Wakasugi H, Takahashi I, Sakano H, Tanaka M, Kawano H, Tanesaki T (1970) Insulin autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycaemia. *J Jap Diabetic Soc* 13: 312-20
- Hirata Y, Ishizu H (1972) Elevated insulin-binding capacity of serum proteins in case with spontaneous hypoglycaemia and mild diabetes not treated with insulin. *Thoku J Exp Med* 107: 277-86
- Jaeger C, Wöhrle M, Federlin K, Bretzel R G (1995) Pancreatic islet xenografts at two different transplantation sites (renal subcapsular versus intraportal): comparison of graft survival and morphology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 Suppl 2: 123-8
- Johnston C, Millward B A, Hoskins P, Leslie R D G, Bottazzo G F, Pyke D A (1989) Islet-cell antibodies as predictors of the later development of type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 32: 382-6
- Jones D B, Hunter NGF R, Duff G W (1990) Heat-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 336: 583-5
- Karjalainen J K (1990) Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes* 39: 1144-50
- Karlsen A E, Hagopian W A, Grubin C E, Dube S, Disteche C M, Adler D A, Bärmeier H, Mathewes S, Grant F J, Foster D, Lernmark A (1991) Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8337-41
- Karlsen A E, Hagopian W A, Petersen J S, Boel E, Dyrberg T, Grubin C E (1992) Recombinant glutamate decarboxylase (representing the single isoform expressed in human islets) detects IDDM-associated 64,000-Mr auto-antibodies. *Diabetes* 41: 1355-9
- Kaufman D L, McGinnis J F, Krieger N R, Tobin A J (1986) Brain glutamate decarboxylase cloned in Agt-II: fusion protein produces γ -aminobutyric acid. *Science* 232: 1138-40

- Kaufman D L, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting G S P, Robinson P, Atkinson M A, Sercarz E E, Tobin A J, Lehmann P V (1993) Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366: 69-72
- Kim J, Richter W, Aanstoot H J, Shi Y, Fu Q, Rajotte R, et al. (1993) Differential expression of GAD₆₅ and GAD₆₇ in human, rat and mouse pancreatic islets. *Diabetes* 42: 1799-1808
- Kockum I, Wassmuth R, Holmberg E, Mechelsen B, Lernmark A (1993) HLA-DQ protection and HLA-DR susceptibility in type 1 (insulin-dependent) diabetes studied in population-based affected families and controls. *Am J Human Genet* 42: 150-67
- Kuglin B, Kolb H, Greenbaum C, MacLaren NGF K, Lernmark A, Palmer J P (1990) Workshop Report: the fourth international workshop on the standardisation of insulin autoantibody measurement. *Diabetologia* 33: 147-50
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lan M S, Wasserfall C, Maclaren N K, Notkins A L (1996) IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6367-70
- Landin-Olsson M, Karlsson A, Dahlquist G, Blom L, Lernmark A, Sundkvist G, et al (1989) Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. *Diabetologia* 32: 387-95
- Landin-Olsson M, Palmer J P, Lernmark A, Blom L, Sundkvist G, Nyström L, Dahlquist G (1992) Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia* 35: 1068-73
- Legay F, Pelhate S, Tappaz M L (1986) Phylogenesis of brain glutamic acid decarboxylase from vertebrates: immunochemical studies. *J Neurochem* 46: 1478-86

- Lühder F, Schlosser M, Haubruck H, Rjasanowski I, Michaelis D, Kohnert K D, Ziegler M (1994) Autoantibodies against GAD₆₅ rather than GAD₆₇ precede the onset of type 1 diabetes. *Autoimmunity* 19: 71-80
- Marshall M O, Hoyer P E, Petersen J S, Hejnaes K R, Genovese S, Dyrberg T, Bottazzo G F (1994) Contribution of glutamate decarboxylase antibodies to the reactivity of islet cell cytoplasmic antibodies. *J Autoimmun* 7: 497-508
- Michelsen B K, Petersen J S, Boel E, Moldrup A, Dyrberg T, Madsen O D (1991) Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8754-8
- Myers M A, Rabin D U, Rowley M J (1995) Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 44: 1290-5
- Nayak R C, Omar M. A K, Rabizadeh A, Srikanta S, Eisenbarth G S (1985) "Cytoplasmic" islet cell antibodies - Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. *Diabetes* 34: 617-9
- Okada Y, Taniguchi H, Shimada C (1976) High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194: 620-2
- Okada Y (1986) Localization and function of GABA in the pancreatic islets. *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery*, Raven Press, New York: 223-40
- Palmer J B, Asplin C M, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu P K, Paquet P L (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222: 1337-9
- Panina-Bordignon P, Lang R, Van Endert P M, Benazzi E, Felix A M, Pastore R M, Spinas G A, Sinigaglia F (1995) Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 181: 1923-7
- Petersen J S, Hejnaes K R, Moody A, Karlsen A E, Marshall M O, Hoier-Madsen M, Boel E, Michelsen B K, Dyrberg T (1994) Detection of GAD₆₅ antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 34: 459-67

- Pociot F, Reimers J I, Andersen I I U (1993) Nicotinamide - biological actions and therapeutic potential in diabetes prevention. *Diabetologia* 36: 574-6
- Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P (1991) GABA and pancreatic B-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* 10: 1275-84
- Richter W, Eiermann T H, Endl J, Brandt M, Kientsch-Engel R, Pujol-Borel R, Scherbaum W (1991) Isolation of human monoclonal IgG-ICA autoantibodies and identification of the target antigen. *Diabetologia* 34 (Suppl 2): A57
- Richter W, Endl J, Eiermann T H, Brandt M, Kientsch-Engel R, Thivolet C, Jungfer H, Scherbaum W A (1992) Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. *Proc Natl Acad. Sci USA* 89: 8467-71
- Ricordi C, Lacy P E, Finke E H, Olack B J, Scharp D W (1988) Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-20
- Riley W, Maclaren N K, Kirscher J, Spillar R P, Silverstein J H, Schatz D A, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter J I (1990) A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *New Engl J Med* 323: 1167-72
- Robbins M S, Sorenson R L, Elde R P, Schmechel D E, Oertel W H (1984) Gamma aminobutyric acid (GABA) inhibition of somatostatin secretion from the isolated perfused rat pancreas and immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the islet beta cell. *Second International Symposium on Somatostatin, Tübingen, Germany*: 165-72
- Roberts E, Frankel S (1950) Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187: 55-63
- Roep B O, Kallan A A, Hazenbos W L W, Bruining G J, Bailyes E M, Arden S D, Hutton J C, De Vries R R P (1991) T-cell reactivity to 38 kD insulin-secretory granule protein in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Lancet* 337: 1439-41

- Rorsman P, Berggren P O, Bokvist K, Ericson H, Möhler H, Pstenson C G, Smith P A (1989) Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA_A-receptor chloride channels. *Nature* 341: 233-6
- Sakaue M, Saito NGF, Tanaka C (1987) Immunohistochemical localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the rat pancreas. *Histochemistry* 86: 365-9
- Scherbaum W A (1994) Cytoplasmic islet cell antibodies (ICA): towards a molecular understanding of the autoantigens. *Clin Endocrinol* 40: 15-8
- Schmidli R S, Colman P G, Bonifacio E, Bottazzo G F, Harrison L C (1994). High level of concordance between assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The First International Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Workshop. *Diabetes* 43: 1005-9
- Schmidli R S, Colman P G, Bonifacio E (1995) Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The Second International GADAB Workshop. *Diabetes* 44: 636-40
- Seissler J, Hering B, Richter W, Glück M, Yassin NGF, Bretzel R G, Boehm B O, Federlin K, Scherbaum W A (1992) Antibodies to the Mr 64,000 (64K) protein in islet cell antibody positive non-diabetic individuals indicate high risk for impaired Beta-cell function. *Diabetologia* 35: 550-4
- Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum W A (1993) Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92: 1394-99
- Seissler J, Morgenthaler N G, Achenbach P, Lampeter E F, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum W A (1996) Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. *Diabetologia* 39: 1351-6
- Solimena M, Folli F, Afarisi R, Pozza G, De Camilli P (1990) Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322: 1555-60

- Solimena M, De Camilli P (1991) Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. *TINS* 14: 452-7
- Sorenson R L, Garry D G, Brelje T C (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves. *Diabetes* 40: 1365-74
- Spencer K M, Tarn A, Dean B M, Lister J, Bottazzo G F (1984) Fluctuating islet-cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet* I: 764-6
- Srikanta S, Ganda O P, Rabizadeh A, Soeldner J S, Eisenbarth G S (1985) First-degree relatives of patients with type I diabetes. Islet-cell antibodies and abnormal insulin secretion. *New Engl J Med* 313: 461-4
- Srikanta S, Ricker A T, McCulloch D K, Soeldner J S, Eisenbarth G S, Palmer J P (1986) Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 35: 139-42
- Tuomi T, Rowley M J, Knowles W J, Chen Q Y, McAnally T, Zimmet P Z, Mackay IR (1994) Autoantigenic properties of native and denatured glutamic acid decarboxylase: evidence for a conformational epitope. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 53-9
- Ujihara N, Kendra D, Gianani R, Boel E, Liping Y, Powers A C (1994) Identification of glutamic acid decarboxylase autoantibody heterogeneity and epitope regions in type 1 diabetes. *Diabetes* 43: 968-75
- Vardi P, Dib S A, Tuttleman M, Connelly J E, Grinbergs M, Radizabeh A et al. (1987) Competitive insulin autoantibody assay. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 36: 1286-91
- Velloso L A, Kämpe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlsson F A (1993) Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 91: 2084-90

- Vincent S R, Hokfelt T, Wu J Y, Elde R P, Morgan L M, Kimmel J R (1983) Immunohistochemical studies on the GABA system in the pancreas. *Neuroendocrinology* 36: 197-204
- Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Böhm B O, Richter W (1997) Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46: 565-71
- Wolf E, Spencer K M, Cudworth A G (1983) The genetic susceptibility of type I (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia* 24: 224-30
- Yamada K, Nowaka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S (1982) Preventive and therapeutic effects of large dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis: An observation made in NOD mice. *Diabetes* 31: 749-52
- Yu L, Gianani R, Eisenbarth G S (1994) Quantitation of glutamic acid decarboxylase autoantibody levels in prospectively evaluated relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 43: 1229-33
- Ziegler A G, Ziegler R, Vardi P, Jackson R A, Soeldner J S, Eisenbarth G S (1989) Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type I diabetes. *Diabetes* 38: 1320-5
- Zimmet P Z, Elliott R B, Mackay I R, Tuomi T, Rowley M J, Pilcher D D, Knowles W J (1994) Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin in islet cell antibody positive presymptomatic type 1 diabetes mellitus: frequency and segregation by age and gender. *Diabet Med* 11: 866-71

VII. ANHANG

1. ABKÜRZUNGEN

64 KD Ak	64 Kilodalton Antikörper (als Synonym für GAD Antikörper, die mittels Immunpräzipitationsassay bestimmt wurden)
65 KD Ak	65 Kilodalton Antikörper (als Synonym für GAD Antikörper, die mittels RIA bestimmt wurden)
cpm	counts per minute
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Foetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAD	Glutamat Decarboxylase
HLA	Human Leucocyte Antigen
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
JDF	Juvenile Diabetes Foundation
Mr	Molecular range
n.s.	nicht signifikant
NOD	Non-obese diabetic
PBS	Phosphate buffered saline
RIA	Radio Immuno Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SMS	Stiff-man syndrome

2. DETAILLIERTE MATERIAL-AUFLISTUNG

2.1 NÄHRMEDIEN

FCS (Foetales Kälberserum)	GIBCO BRL, Eggenstein
Met-freies RPMI 1640 Medium	BIOCHROM, Berlin
RPMI 1640 Medium	GIBCO BRL, Eggenstein

2.2 PUFFER-LÖSUNGEN

Elektrophorese-Laufpuffer (10 x Konzentrat)

10 g	SDS
30 g	Tris
144 g	Glycin
ad 1 l Aqua dest.	

Elutionspuffer (pH 6,8)

80 mM	Tris
2 %	SDS
5 %	Mercaptoethanol

Lysepuffer (pH 7,4)

20 mM	Tris
10 %	Aprotinin
2 mM	EDTA
0,2 mM	PLP
2 mM	PMSF

Probenpuffer für Elektrophorese

Aqua dest.	3,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml
Glycerol	1,6 ml
10 % (w/v) SDS	1,6 ml
Mercaptoethanol	0,4 ml
0,1 % (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml

Tris-Puffer (pH 7,4)

20 mM	Tris
10 %	Aprotinin
2 mM	EDTA
0,2 mM	PLP
2 mM	PMSF
150 mM	NaCl

Triton-Puffer (pH 7,4)

20 mM	Tris
10 %	Aprotinin
2 mM	EDTA
0,2 mM	PLP
2 mM	PMSF
150 mM	NaCl
1 %	Triton X-100

Waschpuffer (pH 7,4)

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
1 %	Triton X-100
1 %	Mercaptoethanol

2.3 CHEMIKALIEN

Acrylamid-Bis-Stammlösung 40 %	BIO-RAD, München
APS (Ammoniumpersulfat)	BIO-RAD, München
Aprotinin	BAYER, Leverkusen
Aqua destillata	BRAUN, Melsungen
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250	CERVA, Heidelberg
EDTA	MERCK, Darmstadt
Essigsäure 100%	MERCK, Darmstadt
Ethanol 95%	MERCK, Darmstadt
Glycerol	MERCK, Darmstadt
Glycin	MERCK, Darmstadt
2-Mercaptoethanol zur Analyse	BIO-RAD, München
Methanol	MERCK, Darmstadt
³⁵ S-Methionin SJ 1015	AMERSHAM, Braunschweig
NaCl	MERCK, Darmstadt
NaOH	MERCK, Darmstadt
Ortho Phosphorsäure 85 % zur Analyse	ISOMERCK, Darmstadt
PBS (Phosphatpuffer-Konzentrat), pH 7,4 ± 0,1	Biolog. Arbeits-GmbH, Lich
PLP (Pyridoxal-5'-phosphat)	MERCK, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA, Deisenhofen
PPO (Diphenoloxazol)	SIGMA, Deisenhofen
Protein A-Sepharose CL 4 B	PHARMACIA LKB, Freiburg
Salzsäure	MERCK, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	BIO-RAD, München
SDS Molecular weight standards (10kD-100kD)	BIO-RAD, München
SDS Molecular weight standards (40 kD-200 kD)	BIO-RAD, München
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	BIO-RAD, München
Tris	BIO-RAD, München
Triton X-100	MERCK, Darmstadt

2.4 MATERIAL UND GERÄTE

CO ₂ -Inkubator	NUAIR, BROWER AG
Bechergläser	KALENSEE, Gießen
Elektrophorese-Kammer	KEUTZ, Reiskirchen
Elektrophoresegel-Gießvorrichtung und Zubehör	KEUTZ, Reiskirchen
Eppendorf-Cups	EPPENDORF, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge	EPPENDORF, Hamburg
Filterpapier	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Geltrockner	KEUTZ, Reiskirchen
Hamilton Spritze	HAMILTON, Vondaruz, CH
Hyperfilm™	AMERSHAM, Braunschweig
Labsonic	BRAUN, Melsungen
Magnetrührer	JANKE u. KUNKEL, Staufen
Meßzylinder	KALENSEE, Gießen
Mini-Protean II Gele	BIO-RAD, München
pH-Meßgerät	SCHOTT, Hofheim
Pipetten, -spitzen	SARSTEDT, Hamburg
Präzisionswaage 3707-MP1	SARTORIUS, Göttingen
RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge	DU PONT, Bad Homburg
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	AGFA, München
Schüttler	KEUTZ, Reiskirchen
Tube PP-F	DU PONT, Bad Homburg
Vakuumpumpe	KEUTZ, Reiskirchen
Vortex	BENDER & HOBEIN, Zürich, CH
Waage	SARTORIUS, Göttingen
Zellkulturflasche	GREINER, Solingen
Zentrifugenröhrchen	BECTON-DICKINSON, Mannheim
Zentrifuge Modell J-6B	BECKMANN, München

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. Federlin, ehem. Leiter der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Becker für die hervorragende Betreuung und Förderung.

Herrn Dr. C. Jaeger danke ich sehr für seine Diskussionsbereitschaft und die ausgezeichnete Weiterbetreuung.

Dem Transplantationsteam unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Bretzel an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der JLU Gießen sei gedankt für die Bereitstellung von humanen Langerhansschen Inseln und die gute Kooperation.

Zahlreiche Anregungen, hilfreiche Tips und eine angenehme Arbeitsatmosphäre verdanke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Immunologischen Labors, insbesondere Herrn M. Stein.

Herrn Dr. J. Seissler, Universität Ulm, danke ich für die methodische Einführung.

Herrn Dr. G. Seibold danke ich stellvertretend für die großzügige Zurverfügungstellung eines Gastplatzes im Strahlencentrum und seine Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. G.L. Fängewisch sei für die Betreuung beim Umgang mit den Radionukliden gedankt.

Herrn W. Pabst vom Institut für medizinische Statistik und Dokumentation danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Martina Herrmann
Geburtsdatum: 13.05.69
Geburtsort: Wertingen
Familienstand: ledig
Konfession: röm.-kath.
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE UND BERUFLICHE AUSBILDUNG

1975 - 1979 **Grundschule Wertingen**
1979 - 1988 **Gymnasium Wertingen**
6/88 Allgemeine Hochschulreife
10/88-3/94 Studium der Humanmedizin: **Justus-Liebig-Universität Gießen**
9/90 Ärztliche Vorprüfung
9/91 1. Ärztliche Prüfung
4/94 2. Ärztliche Prüfung
4/94-4/95 Praktisches Jahr: **Ludwig-Maximilian-Universität München**
4/95 3. Ärztliche Prüfung
5-10/95 Ärztin im Praktikum: **Neurologische Klinik Bad Aibling**
11/95-10/96 Ärztin im Praktikum: **Psychiatrische Klinik der Universität Basel, Schweiz**
seit 11/96 Assistenzärztin: **Psychiatrische Klinik der Universität Basel, Schweiz**

PUBLIKATIONEN

Originalarbeit

Becker F, Lenders W, Raptis G, Scherer S, **Herrmann M**, Bretzel R G, Petzoldt R (1994) Prädiktion und Prävention des Diabetes mellitus Typ I. Med Welt 45: 62-6

Kongreßbeiträge

Becker F, Kräuter K, **Herrmann M**, Sauer H, Petzoldt R, Federlin K (1992) Islet cell-, insulin- and antibodies to the 64 KD islet cell protein as predictors of insulin dependent diabetes mellitus. Molecular aspects of endocrine autoimmunity.

Herrmann M, Becker F, Dyrberg T, Petzoldt R, Federlin K (1994) Korrelation von 64-und 65-KD-Autoantikörpern: Prädiktiver Wert im Vergleich zu Inselzellantikörpern. Med Klinik 89 (Suppl.1): A107